Untersuchungen über die Antikörperbildung nach Applikation von Gonadotropinen in therapeutischer Dosis bei verschiedenen Haustieren

Angelika Kraus

1981

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl
und
aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Infektions- und Seuchenmedizin -
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. W. Leidl und Prof. Dr. H. Buschmann

Untersuchungen über die Antikörperbildung nach Applikation von Gonadotropinen in therapeutischer Dosis bei verschiedenen Haustieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
von

Angelika Kraus
aus München

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	Allgemeiner Oberblick über die Gonadotropine	2
2.2	Anwendung von HCG- und/oder PMSG- Präparaten bei weiblichen Tieren in der Praxis	10
2.3	Antikörperbildung nach dem Einsatz von gonadotropen Hormonen	17
2.3.1	Allgemeiner Oberblick	17
2.3.2	Spezielles zur Anwendung von gonadotropen Hormonen unter dem Gesichtspunkt der Antikörperbildung	25
2.3.2.1	Kleine Versuchstiere	25
2.3.2.2	Hunde	26
2.3.2.3	Schweine	27
2.3.2.4	Kleine Wiederkäuer	28
2.3.2.5	Rinder	29
2.3.2.6	Pferde	33
2.4	Art der Immunreaktion	36
2.4.1	Normaler Verlauf der Immunreaktion	36
2.4.2	Pathologische Folgen der Immunreaktion	40

		Seite
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	49
3.1	Material und Methoden	49
3.1.1	Material	49
3.1.2	Versuchstiere und Versuchsanordnung	51
3.1.2.1	Untersuchungen am Rind	51
3.1.2.2	Untersuchungen am Schwein	52
3.1.2.3	Untersuchungen am Schaf	53
3.1.2.4	Untersuchungen am Pferd	54
3.1.2.5	Untersuchungen am Hund	54
3.1.3	Nachweis der Antikörper	55
3.1.3.1	Passiver Hämagglutinationstest	55
3.1.3.2	Radioimmunoassay mit HCG	60
3.1.3.3	Aktiver kutaner Anaphylaxietest beim Rind mit PMSG	63
4.	ERGEBNISSE	65
4.1	Tierversuche	65
4.1.1	Passiver Hämagglutinationstest	65
4.1.1.1	Untersuchungen am Rind mit PMSG	65
4.1.1.2	Untersuchungen am Schwein mit PMSG	69
4.1.1.3	Untersuchungen am Schwein mit PMSG/HCG	71
4.1.1.4	Untersuchungen am Schwein mit HCG	75
4.1.1.5	Untersuchungen am Schaf mit HCG	78
4.1.1.6	Untersuchungen am Pferd mit HCG	80
4.1.1.7	Untersuchungen am Hund mit HCG	82
4.1.2	Radioimmunoassay mit HCG	85
4.1.3	Aktive kutane Anaphylaxie	91

		Seite
5.	DISKUSSION	97
6.	ZUSAMMENFASSUNG	103
7.	LITERATURVERZEICHNIS	109
	LEBENSLAUF	

1. EINLEITUNG

Eine Steigerung der Reproduktionsleistung unserer Haussäugetiere war schon immer ein Hauptziel der Veterinärmedizin, und somit hat der Einsatz von humanem Choriongonadotropin (HCG) und Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) zweifelsohne nicht nur bei biotechnischen Maßnahmen der Steuerung des Fortpflanzungsgeschehens, sondern auch in der Therapie funktioneller Fortpflanzungsstörungen zu großen Erfolgen geführt. Der Vorteil dieser extrahypophysären Gonadotropine -HCG mit überwiegender LH-Wirkung, PMSG mit FSH- und LH-Wirkung- ist auch in der längeren Halbwertzeit gegenüber den endogenen gonadotropen Hormonen zu sehen.

Die weitgestreute Anwendung von HCG und PMSG bei den Haussäugetieren wirft aber auch die Frage nach möglichen Komplikationen durch immunologische Folgereaktionen auf. Da beide Hormone für alle Tiere, ausgenommen PMSG für das Pferd, körperfremde Proteine mit hohem Molekulargewicht darstellen, kann sowohl eine lokale als auch eine generalisierte Immunantwort auf die wiederholte Applikation in Betracht kommen. Demzufolge könnte eine Neutralisation der Wirksamkeit dieser Hormone oder auch eine Allergie provoziert werden.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob PMSG bei Rind und Schwein, bzw. HCG bei Schwein, Schaf, Pferd und Hund nach therapeutischer Verabreichung in der Lage ist, immunologische Reaktionen zu induzieren. Außerdem sollen Tendenzen aufgezeigt werden, ob und wieweit der passive Hämagglutinationstest mit dem Radioimmunoassay als Nachweismethode von Antikörpern vergleichbar ist.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Allgemeiner Oberblick über die Gonadotropine

Für die Steuerung des männlichen und weiblichen Fortpflanzungsgeschehens ist eine ganze Reihe von Hormonen, sowie deren Wechselbeziehungen untereinander über komplizierte Regelkreise, verantwortlich.

Die unter physiologischen, biotechnischen oder therapeutischen Aspekten bedeutsamen Hormone lassen sich nach KARG et al. (1979) in vier Gruppen einteilen:

1. Sexualhormone, die von den Gonaden gebildet werden
2. Gonadotrope Hormone, Follikel stimulierendes- (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH), aus dem Hypophysenvorderlappen, entsprechend den extrahypophysären Gonadotropinen HCG und PMSG für die praktische Anwendung
3. Releasing Hormone der Gonadotropine (GnRH) aus dem Hypothalamus
4. Speziell beim weiblichen Tier aus dem Uterus stammender luteolytische Faktor, für die Haustiere, soweit bekannt, $PGF_{2\alpha}$

Im Rahmen dieser Arbeit soll besonders auf HCG und PMSG eingegangen werden. Die ersten Berichte über das Vorkommen von HCG im Urin von schwangeren Frauen stammten von ASCHHEIM und ZONDEK (1927), aber bereits 1930 fanden Cole und seine Mitarbeiter (zitiert nach PAPKOFF, 1978) ein ähnliches Gonadotropin, nämlich das PMSG im Serum von graviden Stuten, von dem auch Zondek im gleichen Jahr in Deutschland berichtete.

FSH, LH, HCG und PMSG sind aus zwei nichtidentischen Untereinheiten, α- und ß-Subunit, zusammengesetzt und über eine nicht kovalente Verbindung miteinander verknüpft (Tabelle 1). Jede Untereinheit dieser Hormone besitzt zwei kovalent gebundene Kohlenhydratseitenketten. Nach der Dissoziation mittels geeigneter chemischer Methoden besitzt die α- und ß-Untereinheit nur noch sehr geringe biologische Aktivität, erklärbar durch deren Kontamination entweder mit einem intakten Hormon oder der entsprechenden komplementären Subunit (VAITUKAITIS, 1978). Eine irreversible Denaturierung findet durch die Aufspaltung nicht statt, da z.B. nach einer Wiedervereinigung der α- und ß-Einheit ein signifikanter Teil der ursprünglichen biologischen Aktivität wiedererlangt wird (MORGAN und CANFIELD, 1971; VAITUKAITIS, 1978; WALKER FARMER und PAPKOFF, 1979):

Der Gesamtkohlenhydratanteil der verschiedenen gonadotropen Hormone weist sehr starke Speziesunterschiede auf. Beim LH des Pferdes liegt er mit 23,6 % weit über den Werten von Schaf, Rind und Schwein mit einem gesamten Kohlenhydratanteil zwischen 12 und 13 % (PAPKOFF, 1969; SHERWOOD und McSHAN, 1977; GINTHER, 1979).

Die in allen Glykoproteinen vorkommenden Monosaccharide Mannose, Galaktose, Fruktose, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine und Sialinsäure (N-acetyl-Neuraminsäure) bilden eine komplexe Kette, die über eine N-acetyl-glucosaminyl-asparagin-Brücke mit der Polypeptidkette verbunden ist (BAHL, 1969; MORI, 1970; SHERWOOD und McSHAN, 1977; BIRKEN und CANFIELD, 1978; VAITUKAITIS, 1978; GINTHER, 1979; STEVENS, 1979). Der

Tab. 1: Übersicht über Chemie und Physiologie der gonadotropen Hormone FSH und LH der Adenohypophyse sowie HCG und PMSG der Plazenta

Eigenschaften	FSH	LH
- Art d. Hormons	Glykoprotein	Glykoprotein
- Bildungsort	basophile Zellen der Adenohypophyse	
- Freisetzung	durch Einwirken von spezifischen Releasing-hormonen des Hypothalamus	
- Molekulargewicht	25000 - 32000	28000 - 30000
	(je nach Spezies)	
- Isoelektrischer Punkt	4,1 - 4,8	4,5 - 9,8
	(je nach Spezies)	
- Kohlenhydrat-anteil (%)	ca. 25	12 - 23
- Untereinheiten	α und ß	α und ß
- Verbindung zw. α- u.ß-Subunit	nicht kovalent	
- Wirkung:		
1. weiblich	Follikelentwicklung, -wachstum u. -reifung	Follikelreifung, Ovulation, Corpus luteum-Bildung
2. männlich	Stimulation der Spermatogenese	
	Androgen-binding-protein- und Inhibin-Synthese i. Sertolizellen	Androgensynthese i. Leydigschen Zwischenzellen

Tab. 1: Fortsetzung

Eigenschaften	HCG	PMSG
- Art d. Hormons	Glykoprotein	Glykoprotein
- Bildungsort	Msch.: Synzitiotrophoblasten d. Plazenta	Pfd.: Epithelzellen d. Krater i. Endometrium
- Freisetzung	ab 14. Woche d. Gravidität	40. - 140. Tag d. Gravidität
- Molekulargewicht	38000	64030
- Isoelektrischer Punkt	3,8 - 5,1	-
- Kohlenhydratanteil (%)	ca. 30	46,7
- Untereinheiten	α und ß	α und ß
- Verbindung zw. α- u.ß-Subunit	nicht kovalent	
- Wirkung:		
1. weiblich	LH-ähnlich	überwiegend FSH-, aber auch LH-ähnlich
2. männlich	"	"

Literaturnachweis: ALLEN und STEWART, 1978; BERGFELD et al., 1978; BIRKEN und CANFIELD, 1978; BUDDECKE, 1971; CHRISTAKOS und BAHL, 1979; COLE, 1969; DAVIES et al., 1978; ENBERGS, 1965; GINTHER, 1979; GOSPODAROWICZ, 1972; HANSSON et al., 1973; LORAINE, 1961; McDONALD, 1969; MERZ et al., 1974; MORI, 1970; PAPKOFF, 1969; SCHAETZ, 1977; SCHAMS et al., 1978; SHERWOOD und McSHAN, 1977; STEVENS, 1979; VAITUKAITIS, 1978;

Mannoseanteil ist sowohl im FSH als auch im HCG höher als in den übrigen extrahypophysären Gonadotropinen. Galaktose kommt im LH des Rindes überhaupt nicht vor, während HCG und PMSG einen sehr hohen Prozentsatz dieser Substanz, zwischen 10 und 20 %, aufweisen (LORAINE, 1961; SHERWOOD und McSHAN, 1977; CHRISTAKOS und BAHL, 1979; GINTHER, 1979). Fruktose ließ sich lediglich bei PMSG und FSH des Pferdes in größeren Mengen nachweisen (PAPKOFF, 1978; CHRISTAKOS und BAHL, 1979). Auch der Glucosamingehalt von LH, FSH des Pferdes und PMSG liegt mit Werten von 9 - 10 % recht hoch (PAPKOFF, 1978; CHRISTAKOS und BAHL, 1979). Erwähnenswert ist ferner der hohe Sialinsäuregehalt im LH des Pferdes, im FSH von Pferd, Schwein und Schaf als auch im HCG und PMSG. Es wurde nachgewiesen, daß diese Säure einerseits für die Funktion dieser Hormone notwendig ist, da nach ihrer enzymatischen Abspaltung die biologische Wirksamkeit stark reduziert ist (SHERWOOD und McSHAN, 1977; BIRKEN und CANFIELD, 1978), zum anderen wird angenommen, daß sie die biologische Halbwertzeit dieser Hormone verlängert, indem deren Aufnahme und Abbau durch die Leber gehemmt wird (MORELL et al., 1971; BIRKEN und CANFIELD, 1978). So beträgt die Halbwertzeit von PMSG bei Stuten und Wallachen sechs Tage (PAPKOFF, 1978; GINTHER, 1979), 24 - 26 Stunden bei Kaninchen (CATCHPOLE et al., 1935) und Ratten (COLE et al., 1967), während die Halbwertzeit von HCG beim Menschen zwischen 24 und 36 Stunden liegt (VAITUKAITIS, 1978). STUPNICKI und SCHAMS (1974) bestimmten eine Halbwertzeit von markiertem HCG im Rinderblut von 60 Minuten in der schnellen, und 33 bis 82 Stunden in der zweiten, langsamen Phase nach intravenösen und intramuskulären Injektionen.

Mit hochgereinigten Gonadotropinen konnte die genetisch festgelegte Aminosäurenfrequenz z.T. aufgeklärt werden. Auch hier gibt es Speziesunterschiede. Beispielsweise setzt sich HCG aus insgesamt 237 Aminosäuren zusammen, wovon 92 auf die α-Untereinheit und 145 auf die ß-Untereinheit entfallen. Die Aminosäuren Asparaginsäure, Valin, Cystin, Prolin und Glutaminsäure kommen gehäuft vor (BIRKEN und CANFIELD, 1978). Neben den bisher genannten Aminosäuren kommt noch Lysin in größeren Mengen vor (RATHAM und SAXENA, 1978; GINTHER, 1979). Prolin, Cystin, Threonin und Serin treten im LH des Pferdes (GINTHER, 1979) und des Schafes (PAPKOFF, 1969) gehäuft auf, während Tryptophan fehlt. Bei PMSG fällt neben Serin, Threonin, Alanin und Glycin besonders der hohe Gehalt an Prolin und Glutaminsäuren auf (GOSPODAROWICZ, 1972; PAPKOFF et al., 1978; CHRISTAKOS und BAHL, 1979; GINTHER, 1979). Aus diesen Untersuchungen geht die große Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Hormonen und deren Untereinheiten hervor. Weiterhin belegen sie, daß bei den einzelnen Tierarten geringe Speziesunterschiede zu finden sind.

Mit der Isolierung und Charakterisierung der Subunits verschiedener Gonadotropine und durch die Herstellung spezifischer Antiseren wurde es möglich, die Kreuzreaktivität zwischen diesen Hormonen menschlichen und tierischen Ursprungs besser zu verstehen. So zeigte sich im Radioimmunoassay (RIA) mit den hochgereinigten Glykoproteinen HCG, LH, FSH und TSH (Thyreoidea stimulierendes Hormon) des Menschen und einem α-HCG-Antiserum eine vollständige Kreuzreaktivität, was auf die weitgehende strukturelle Homogenität der α-Subunits dieser Hormone hinweist

(MORGAN und CANFIELD, 1971; DONINI et al., 1975; TALWAR et al., 1976; STEVENS, 1977; TALWAR, 1978; VAITUKAITIS, 1978). Im entsprechenden Versuchen mit ß-HCG-Antiserum und ß-HCG, HCG, hFSH, hLH und hTSH zeigten diese fünf Hormone unterschiedliche Reaktionen (DONINI et al., 1975; VAITUKAITIS, 1978). Größere Parallelen ergaben sich nur zwischen ß-HCG und hLH, die eine 85 %ige Identität der ersten 110 Aminosäuren aufweisen (MORGAN et al., 1973; GOOD et al., 1977). Diese geringe Differenz ließ sich auch im RIA mit ß-HCG-Antiserum und nativen HCG, ß-HCG und hLH in signifikant unterschiedlichen Dosis-Wirkungskurven nachweisen (VAITUKAITIS, 1978). Auch konnte am Beispiel von ß-HCG-Antiserum und hLH beobachtet werden, daß die Kreuzreaktionen umso größer waren, je weniger gereinigt die Präparate vorlagen (DONINI et al., 1975). Entsprechende Ergebnisse wurden zwischen den Gonadotropinen des Pferdes und den α- bzw. ß-PMSG-Antiseren von FARMER und PAPKOFF (1979) im RIA gefunden.

Als das immunologische Verhalten des α-LH von Mensch, Schaf, Rind und Ratte mit α-hLH-Antiserum im RIA getestet wurde, ergab sich zwischen dem Antiserum und dem LH der Tiere keinerlei Reaktion (VAITUKAITIS, 1978). Dieses Ergebnis war überraschend, da die Primärstruktur der α-Untereinheit von Mensch, Schwein, Schaf, Rind und Ratte große Ähnlichkeiten besitzt (SHERWOOD und McSHAN, 1977; VAITUKAITIS, 1978). Wurde jedoch der RIA mit dem ß-LH-Subunit von Mensch, Schaf, Rind und Ratte und einem ß-hLH-Antiserum durchgeführt, ergab sich bei allen eine vollständige immunologische Kreuzreaktion mit dem Antiserum (VAITUKAITIS et al., 1972). Trotz großer struktureller Ähnlichkeit von 70 -

80 % zwischen der α-Untereinheit von PMSG mit anderen Gonadotropinen (MOORE et al., 1979) und den ß-Subunits von HCG, oLH, pLH und hLH wurde hier keine Kreuzreaktion zwischen den Spezies beobachtet (MORI et al., 1971 a; SHERWOOD und McSHAN, 1977; VAITUKAITIS, 1978). Diese Ergebnisse konnten auch mittels der Agar-Gel-Doppel-Diffusion und dem Hämagglutinationshemmtest mit den Hypophysengonadotropinen von Rind, Pferd, Schwein und Schaf und einem PMSG- und HCG-Antiserum bestätigt werden (MORI et al., 1971 b). SCHAMS und PAPKOFF (1972) wiesen obige Ergebnisse, daß ein PMSG-Antiserum weder mit HCG, noch mit hLH, oLH, hFSH oder oFSH reagiert, im Ouchterlony-Test nach. Diese Arbeiten lassen darauf schließen, daß die homologen Abschnitte innerhalb dieser Hormone liegen und somit immunologisch unzugänglich sind. Die Kreuzreaktionen zwischen den Spezies beruhen auf der ß-Untereinheit, die innerhalb einer Spezies auf der α-Untereinheit (SCHAMS und PAPKOFF, 1972; LERARIO et al., 1978).

2.2 Anwendung von HCG- und/oder PMSG-Präparaten bei weiblichen Tieren in der Praxis

Da die Sexualfunktionen beim männlichen Tier gegenüber dem weiblichen ohne wesentliche Schwankungen ablaufen, unterliegen diese einer geringeren Störanfälligkeit. Außerdem erfolgt aus zuchthygienischen und wirtschaftlichen Gründen nur selten eine hormonelle Therapie an Vatertieren.

Bei weiblichen Tieren werden als Hormonpräparate neben den spezifischen Wirkstoffen der Gonaden, wie Östrogene und Gestagene, hauptsächlich Gonadotropine oder Kombinationspräparate aus diesen beiden Gruppen eingesetzt. Dabei sollten als Ursache für funktionelle Störungen neben endogenen Faktoren Haltungs- und Fütterungsfehler nicht vergessen werden. Eine genaue Diagnose gilt als Voraussetzung für jede Therapie, da ein Großteil der Hormone bei falscher Indikation oder zu hoher Dosierung nicht nur in der Wirkung versagt, sondern auch schwere Schäden hervorrufen kann. Beim therapeutischen Einsatz ist zu bedenken, daß diese Wirkstoffe nicht imstande sind, Mangelzustände irgendeiner Art dauerhaft zu überbrücken (BUSCH, 1975; SCHAETZ, 1977; MERKT und KLUG, 1979).

HCG- und/oder PMSG-Präparate werden entweder allein oder in Kombination mit anderen Hormonen bei funktionellen Fortpflanzungsstörungen sowie unter biotechnischen Aspekten, wie Brunstinduktion, -synchronisation und Superovulationen, herangezogen, mit dem Ziel, bestimmte Phasen der Fortpflanzung innerhalb der biologischen Möglichkeiten zu manipulieren (Tabelle 2 bis 6).

Am Beispiel der durch LH-Mangel bedingten Ovarialzyste des Rindes soll die Mannigfaltigkeit der Therapiemöglichkeiten demonstriert werden. Das Ziel der Behandlung ist die Bildung eines funktionstüchtigen Corpus luteums und das Ingangsetzen des Zyklus. Heute gilt als Standarttherapie der Ovarialzyste des Rindes:

1. Die LH-Substitution durch intravenöse, intramuskuläre oder intrazystöse HCG-Applikation, wobei die intraovarielle Verabreichung nach GONZLER und HUBER (1967) und YAMAUCHI (1970) mehr Sicherheit vor einer Antikörperbildung gegen das Hormon bieten soll.
2. Die kombinierte Injektion von HCG und Progesteron (NAKAO et al., 1978), deren Wirkungsweise noch unbekannt ist.
3. Durch die synthetische Herstellung von Gonadotropin-Releasing-Hormonen (GnRH) kam diese Möglichkeit der Zystenbehandlung des Rindes hinzu. Es kommt zu einer Ausschüttung von endogenem LH aus dem Hypophysenvorderlappen (GARVERICK et al., 1976).
   Der Wirkungsmechanismus von GnRH auf die Zyste ist noch ungeklärt, jedoch gibt es Hinweise dafür, daß GnRH die Ovulation eines Tertiärfollikels mit anschließender Gelbkörperbildung auslöst (BERCHTHOLD et al., 1978).

Tab. 2: Anwendungsgebiete von HCG und/oder PMSG in Therapie und biotechnischen Verfahren beim weiblichen Rind

	HCG	PMSG
1. Therapeutischer Einsatz		
- Brunstinduktion	HCG + FSH	PMSG + Östradiol
- Postpartale Anöstrie	HCG + FSH	PMSG + Progesteron
- Anöstrie des Jungrindes	HCG + FSH	+
- Periodizitätsstörungen des Zyklus	+	-
- Ovulationsanomalien	+	-
- Ovarialzysten	+	-
2. Biotechnische Verfahren		
- Brunstinduktion	HCG + FSH	+
- Brunstsynchronisation	+	+
- Superovulation	-	+
- Erhöhung der Konzeptionsrate	HCG + GnRH	-

Literaturnachweis: BUSCH, 1975; GRUNERT und DIEZ, 1976; GÖNZLER und HUBER, 1967; KALTENBACH, 1980; LEIDL et al., 1979; SCHAETZ, 1977; SEGUIN, 1980; SIMON, 1977; SMIDT und ELLENDORFF, 1969; ZENIGANIS, 1980

Tab. 3: Anwendungsgebiete von HCG und/oder PMSG in Therapie und biotechnischen Verfahren beim weiblichen Schwein

	HCG	PMSG	PMSG/HCG
1. Therapeutischer Einsatz			
- Anöstrie post lactationem	HCG + FSH	+	+
- Anöstrie der Jungsauen	HCG + FSH	+	+
- Ovarialzysten	+	-	-
2. Biotechnische Verfahren			
- Brunstinduktion	+	+	+
- Brunstsynchronisation	-	+	+
- Superovulationen	+	+	-

Literaturnachweis: BERGFELDT und EHLERT, 1977; BOSTEDT, 1979; BUSCH, 1975; HODSON, 1980; POLANCO et al., 1978; POLANCO et al., 1980; SCHAETZ, 1977; SCHLEGEL et al., 1978a, b; SCHLEGEL und STENZEL, 1978; SCHUMM et al., 1979; SMIDT und ELLENDORFF, 1969

Tab. 4: Anwendungsgebiete von HCG und/oder PMSG in Therapie und biotechnischen Verfahren beim weiblichen Schaf

	HCG	PMSG
1. Therapeutischer Einsatz		
- Anöstrie	HCG + FSH	-
- Ovarzystenverdacht	+	-
2. Biotechnische Verfahren		
- Brunstinduktion	-	PMSG + Progesteron
- Brunstsynchronisation	-	PMSG + Progesteron
- Superovulationen	+	+

Literaturnachweis: BENTHIN und RÖSTEL, 1978; BINDON und PIPER, 1977; BOSTEDT, 1979; BUSCH, 1975; QUINLIVAN, 1980; SCHAETZ, 1977; SMIDT und ELLENDORFF, 1969; WHYMAN et al., 1979

Tab. 5: Anwendungsgebiete von HCG und/oder PMSG in Therapie und biotechnischen Verfahren bei der Stute

	HCG	PMSG
1. Therapeutischer Einsatz		
- Brunstintensitätsstörung	-	+
- Anöstrie des Jungpferdes	-	+
- Anöstrie des adulten Tieres	-	+
- Rosse ohne Ovulation	+	-
- übersteigerte Rosse	+	-
- Ovarialzysten	+	-
2. Biotechnische Verfahren		
- Östrusverkürzung	+	-
- Brunstsynchronisation	+	-
- Erhöhung der Konzeptionsrate	+	-

Literaturnachweis: BUSCH, 1975; MERKT und KLUG, 1979; SCHAETZ, 1977; SMIDT und ELLENDORFF, 1969; VOSS et al., 1975

Tab. 6: Anwendungsgebiete von HCG und/oder PMSG in Therapie und biotechnischen Verfahren bei der Hündin

	HCG	PMSG
1. Therapeutischer Einsatz		
- Daueröstrus	+	-
2. Biotechnische Verfahren		
- Brunstinduktion	+	+

Literaturnachweis: BUSCH, 1975; SMIDT und ELLENDORFF, 1969

2.3 Antikörperbildung nach dem Einsatz von gonadotropen Hormonen

2.3.1 Allgemeiner Oberblick

Nach der klassischen Definition ist ein Antigen ein Molekül, das die Fähigkeit besitzt, im Organismus eine Immunantwort zu induzieren und mit den entstandenen Produkten (Antikörper oder Immunzellen) zu reagieren (SELL, 1977). Diese Antigene werden als Immunogene oder Vollantigene bezeichnet, während Haptene oder Halbantigene eine Antikörperproduktion oder Immunzellbildung nicht auslösen können, wohl aber mit vorhandenen Antikörpern oder Immunzellen reagieren. Haptene können dennoch immunogene Eigenschaften besitzen, indem sie künstlich an hochmolekulare Trägerproteine gekoppelt werden (ROLLE und MAYR, 1978).

Äußerst großer Einfluß auf die Reaktion des Organismus geht von der Art des applizierten Antigens aus, wobei die Molekülgröße einen wichtigen Parameter darstellt. Da es sich bei HCG als auch bei PMSG um hochmolekulare Glykoproteine handelt, besitzen sie nicht nur antigene, sondern auch immunogene Eigenschaften. Außerdem spielt die Anzahl und Anordnung der Antigendeterminanten, Molekülkonfiguration, Rigidität des Antigens sowie dessen Löslichkeit und Verweildauer im Organismus eine ebenso große Rolle (CRIEP, 1969; ABRAMOFF, 1970) (siehe auch Kapitel 2.1). Ferner ist zu erwähnen, daß es sich bei PMSG und HCG um ein für alle Tierarten, ausgenommen PMSG für das Pferd, artfremdes Glykoprotein handelt (LEATHEM und RAKOFF, 1948; COLE

et al., 1957; RAO und SHAHANI, 1961; ENBERGS, 1965; ABRAMOFF, 1970). Aber auch körpereigene Stoffe können unter bestimmten Voraussetzungen immunogen werden und Autoimmunreaktionen hervorrufen (SCHUHMACHER, 1979).

RAO und SHAHANI (1961) berichteten, daß HCG nur in Verbindung mit Freund'schem Adjuvans antigen wirkt, bedingt durch das geringe Molekulargewicht dieses Hormons. Indessen wiesen SCHUYLER et al. (1950) nach, daß die Seren von HCG-immunisierten Kaninchen, ohne Adjuvanszusatz, spezifische Antikörper enthielten. Heute wird sowohl HCG als auch PMSG als antigene Substanz betrachtet (ROSS, 1977).

Nicht alle Tierarten beantworten eine Antigenzufuhr im gleichen Ausmaß und auf die selbe Art, da diese Fähigkeiten unter genetischer Kontrolle stehen, d.h. es gibt sog. "gute" und "schlechte" Antikörperbildner (STEFFEN, 1968; SELL, 1977; GATES und BOZARTH, 1978). So ist beispielsweise das Kaninchen im Gegensatz zu Meerschweinchen und Rind für die Gewinnung zirkulierender Antikörper sehr gut geeignet. Weiterhin wird die Immunreaktion vom Zustand des reagierenden Tieres beeinflußt. Die besten Ergebnisse werden mit gesunden, adulten Tieren erreicht (STEFFEN, 1968; CRIEP, 1969), da bei sehr jungen oder sehr alten Tieren das Antikörperbildungsvermögen auf einen Antigenreiz hin qualitativ und quantitativ reduziert ist, wobei allerdings die Art des Antigens eine entscheidende Rolle spielt (BUSCHMANN, 1970). Aber auch andere Faktoren wie Krankheit oder Art der Ernährung können die Reaktion des Organismus beeinflussen.

Von Bedeutung ist weiterhin das Geschlecht des Tieres, da weibliche Tiere die männlichen in ihrer Antikörperproduktion übertreffen, und die männlichen Kastraten aufgrund ihrer veränderten Hormonsituation nach dem weiblichen Muster reagieren (FABRIS und PIANTANELLI, 1976). Dieser Unterschied tritt erst mit dem Eintritt der Geschlechtsreife und durch den Östrogeneinfluß ein und wird durch die Heterozygotie der weiblichen Tiere, bezüglich der an den X-Chromosomen lokalisierten Gene, erklärt (BUSCHMANN, 1974). Auch aus diesem Grunde sind Untersuchungen über eine mögliche Antikörperbildung im Laufe einer Hormontherapie bei weiblichen Tieren besonders interessant. Im Gegensatz dazu berichteten AL-KAFAWI et al. (1974) und FAULKNER et al. (1975) von Versuchen beim Hund mit HCG, in denen das Geschlecht keinen Einfluß auf die Antikörperproduktion ausübt.

Die Form, in der das Antigen verabreicht wird, beeinflußt die Antikörperbildung. Wird das Antigen in öliger Suspension, auch unter Zusatz toter Mykobakterien wie z.B. Freund'sches Adjuvans komplett (FAC), appliziert, kommt es neben einer gesteigerten Infiltration mononukleärer Zellen zur Abkapselung des öligen Depots, wodurch das Antigen über einen größeren Zeitraum in hoher Konzentration zur Verfügung steht (STEFFEN, 1968; STUPNICKI und SCHAMS, 1974; KORNDÖRFER und SCHMID-LINDNER, 1975). Dadurch wird das Antigen nur langsam abgebaut und somit die Immunantwort gesteigert (KIND, 1970). Da die gonadotropen Hormone i.d.R. lyophilisiert vorliegen und in physiologischer Kochsalzlösung zur Injektion aufgelöst werden, kommen

derartige Zusätze nur unter experimentellen Bedingungen zur Anwendung.

In diesem Zusammenhang soll noch auf Proteinverunreinigungen fast aller biologischen Präparate und auf die sog. "Hilfsstoffe" verwiesen werden, die nicht nur Arzneimitteln, sondern auch Nahrungs- und Futtermitteln zugesetzt werden (FORCELLEDO und DE LA LASTRA, 1977). Bei diesen Zusätzen handelt es sich um Suspensionsvermittler, Entschäumer u.a., die erst durch ihre Kopplung an entsprechende Proteine antigenen bzw. immunogenen Charakter erlangen (COLE et al., 1957; MAYR und BIBRACK, 1970). Demzufolge können Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Hormonen durch die Verwendung möglichst gereinigter Präparate reduziert werden.

Die Applikationsart des Antigens ist für den Ort, wie auch für die Intensität der Antikörperbildung von Bedeutung. Nach einer intravenösen Injektion kommt es im allgemeinen zur humoralen Immunantwort, nach einer lokalen intramuskulären oder subkutanen Applikation mehr zur zellulären Reaktion (STEFFEN, 1968; SELL, 1977). Nach Untersuchungen von MÖLLER und BERCHTHOLD (1980) über den Vergleich zwischen den Applikationsarten i.v., s.c. und i.m. traten nach intravenöser Verabreichung von HCG beim Rind, in therapeutischer Dosierung, keine Antikörper auf. Bei der intramuskulären Behandlung waren spezifische Antikörper nach der zweiten Injektion nachweisbar, nach subkutaner Applikation teilweise nach der ersten, sicher jedoch nach der zweiten HCG-Verabreichung, die 10 Tage nach der ersten folgte. PIGON et al. (1960) und AL-KAFAWI et al. (1974) konnten

nach subkutaner, intradermaler oder intramuskulärer HCG- bzw. PMSG-Applikation beim Schaf bzw. beim Hund keine Unterschiede in der Stärke der Antikörperbildung nachweisen.

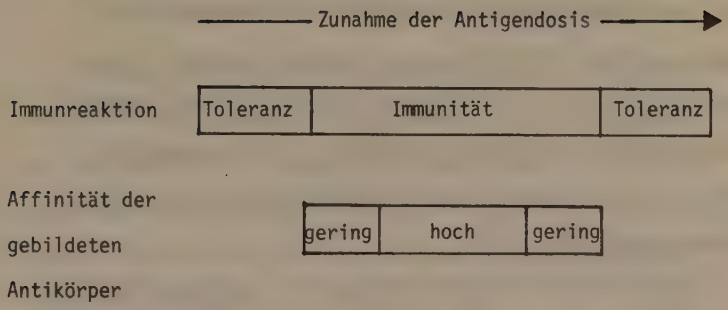
Der Zeitraum zwischen den Injektionen spielt für die Art der Immunreaktion ebenfalls eine Rolle, steht aber in engem Zusammenhang mit der Häufigkeit und Dosis des verabreichten Antigens. Auf die Bedeutung der Antigendosis soll im Folgenden gesondert eingegangen werden.

Nach der Erstapplikation dauert die Latenzperiode, d.h. der Zeitraum zwischen Antigenzufuhr und dem Auftreten der ersten Antikörper, abhängig von Dosis und Art des Antigens, ca. vier bis sieben Tage. Das Zeitintervall zwischen Erst- und Boosterinjektion ist für eine erfolgreiche Sekundärantwort so zu wählen, daß die Anwesenheit von sog. "memory-cells" zum Zeitpunkt der zweiten Injektion gegeben ist. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt die Ausbildung von nachweisbaren Antikörpern ungefähr innerhalb von zwei bis drei Tagen (STEFFEN, 1968). Der maximale Antikörpertiter wird sowohl nach Primär- als auch nach Sekundärinjektionen ca. am 7. bis 10. Tag erreicht; allerdings bleibt eine sehr hohe Antikörperkonzentration mit zunehmender Affinität zum Antigen und zunehmender Kreuzreaktivität über einen Zeitraum von drei bis fünf Wochen bestehen (STEFFEN, 1968; BUSCHMANN, 1973; SELL, 1977). Die Menge der gebildeten Antikörper ist für gewöhnlich nach der Boosterinjektion mit dem gleichen Antigen viel größer als nach der Erstbehandlung. Aus diesem Grunde wird im allgemeinen für die Herstellung eines spezifischen Antiserums eine Reihe von Applikationen unter Zu-

satz eines Adjuvans vorgenommen (STEFFEN, 1968). Im Rahmen einer länger andauernden Hormontherapie mit Gonadotropinen besteht mit steigender Injektionshäufigkeit zunehmend die Gefahr der spezifischen Antikörperbildung.

Die Möglichkeit der Immunantwort nach einer HCG- oder PMSG-Therapie unterliegen einer Vielfalt von Einflüssen, so daß im Rahmen dieser Arbeit nur wesentliche Faktoren und Zusammenhänge aufgezeigt werden können. Neben den bisher genannten Einflüssen spielt, auch im Hinblick auf die Heterogenität der gebildeten Antikörper, die Antigendosis eine sehr große Rolle, so daß auf sie noch eingegangen werden soll.

In der Regel kommt es nach einer hohen Antigendosis zu einer hohen Antikörperanfangskonzentration mit relativ raschem Titerabfall, wobei die verbleibenden Antikörper eine geringe Affinität zum Antigen aufweisen. Durch eine geringe Dosis bleibt zwar der Antikörperspiegel im Serum zunächst relativ niedrig, steigt dann aber an und bleibt auf einer hohen Konzentration hochaffiner Antikörper. Auch andere Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Antikörperpopulation im Laufe der Zeit einen Reifungsprozess durchmacht (CRIEP, 1969; BUSCHMANN, 1973; ROLLE und MAYR, 1978). Die folgende schematische Darstellung soll die Zusammenhänge zwischen Antigendosis und Immunantwort bzw. Affinität der gebildeten Antikörper wiedergeben (BUSCHMANN, 1973):



Es kann also sowohl eine geringe als auch eine sehr hohe Antigenzufuhr zur Immuntoleranz führen, da einerseits die wenigen Antigenmoleküle überhaupt nicht oder nur mit wenigen, hochaffinen immunkompetenten Zellen in Berührung kommen, und andererseits führt der Dosisanstieg dann zu einer statistischen Trefferverteilung, d.h. die immunkompetenten Zellen, die bereits mit dem Antigen in Kontakt getreten sind, differenzieren sich zu antikörperbildenden Zellen weiter. Durch das Oberwiegen der Zellen mit durchschnittlicher Affinität besitzt die Antikörperpopulation insgesamt nur geringe Affinität. Ein weiterer Anstieg der Antigendosis führt zu einem Zusammentreffen von vorwiegend hochaffinen Zellen mit dem Antigen, um sich dann weiter zu differenzieren, resultierend in einer Antikörperpopulation mit hoher Antigenaffinität. Der weitere Antigenanstieg führt zunächst dazu, daß auch die schwach affinen Zellen mit dem Antigen in Kontakt treten und somit die Antikörperpopulation nur noch eine schwache Affinität aufweist, und schließlich eine Erschöpfungsdifferentiation eintritt, da die Teilung der "Gedächtniszellen"

unterbleibt, und die antikörperbildeneden Plasmazellen nach 70 - 80 Stunden absterben (STEFFEN, 1968; BUSCHMANN, 1973; ROLLE und MAYR, 1978). Diese enge Beziehung zwischen Dosis und Wirkung konnte auch in anderen Studien mit PMSG (CHIRAS und GREENWALD, 1978; GATES und BOZARTH, 1978) demonstriert werden, da eine zu geringe oder zu hohe Dosierung vom Ovar unbeantwortet blieb.

Daraus ergibt sich, daß die Menge der gebildeten Antikörper gegenüber der Affinität derselben eine untergeordnete Rolle spielt, schon deshalb, weil beispielsweise bei einer Hormontherapie das Tier nur mit geringen Mengen in Berührung kommt.

2.3.2 Spezielles zur Anwendung von gonadotropen Hormonen unter dem Gesichtspunkt der Antikörperbildung

Bei Durchsicht der Literatur muß festgestellt werden, daß die Zielsetzungen der wissenschaftlichen Arbeiten, die mit HCG oder PMSG in Zusammenhang stehen, sehr variieren. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden nur die Literatur berücksichtigt werden, die mit einer Antikörperbildung nach HCG- oder PMSG-Applikation in Verbindung steht.

2.3.2.1 Kleine Versuchtiere

SCHLUMBERGER und ANDERER (1969) berichteten, daß die Anwesenheit von Antikörpern gegen HCG Infertilität auslösen kann, indem sie Mäusen Kaninchenantiserum gegen HCG verabreichten, nachdem sie zuvor gegenüber den γ-Globulinen der Kaninchen immuntolerant gemacht worden waren. Die Mäuse reagierten mit einem verlängerten Vaginalöstrus (18 - 60 Tage) oder mit einer Sterilität (37 - 130 Tage). Dieser Unterschied in der Dauer wird dadurch erklärt, daß beide Phänomene von verschiedenen, mit den Kaninchenantikörpern gegen HCG kreuzreagierenden, endogenen Gonadotropinkonzentrationen ausgehen. Vom Abbau der Kaninchenantikörper in der Maus ausgehend, muß man annehmen, daß durch die Zunahme der endogenen Gonadotropinkonzentrationen die Sexualfunktionen im Laufe der Zeit wieder einsetzen, und zwar der Vaginalöstrus zuerst, da er von einer geringeren Gonadotropinkonzentration als die Fertilität ausgeht. Die Immunisierung von Ratten und Kaninchen mit ovinem LH (WAKABAYASHI und TOMOAKI,

1966), mit bovinem LH (LAURENCE und ICHIKAWA, 1968; TALAAT und LAURENCE, 1971; FAULKNER et al., 1975) und mit ovinem FSH (TALAAT und LAURENCE, 1969) führte aufgrund der Kreuzreaktionen zwischen den, gegen die exogenen Gonadotropine gerichteten, Antikörpern und den endogenen gonadotropen Hormonen zu Veränderungen, wie Ausbleiben der Ovulation, Ovar- und Hodenatrophie u.a.. Demgegenüber führte die Immunisierung von Kaninchen mit HCG und FAC zu einer Antikörperbildung, aber zu keiner Beeinflussung der endogenen Gonadotropine (GLASS und MROUEH, 1967), während Antikörper gegen ovines (ELY und CHEN, 1967) und bovines (REICHERT und TREADWELL, 1967) LH die biologische Aktivität von HCG in Rattenversuchen hemmte.

2.3.2.2 Hunde

In Immunisierungsversuchen an Hunden mit HCG und FAC konnten AL-KAFAWI et al. (1974) und FAULKNER et al. (1975) feststellen, daß weder das Geschlecht, noch die Art der Applikation, hier s.c., i.m. und i.c., die Antikörperproduktion beeinflußte. Eine Kreuzreaktion zwischen dem HCG-Antiserum und dem endogenen LH konnte weder an den Hunden beobachtet, noch im Radioimmunoassay gefunden werden (AL-KAFAWI et al., 1974).

Als Folge einer Immunisierung von Rüden mit bovinem LH und FAC trat neben einer Atrophie der Genitalorgane das Unvermögen zu ejakulieren auf. Mit ovinem LH und FAC wurde ein verspäteter Pubertätseintritt bei Rüden und Hündinnen registriert. Beide Beobachtungen wurden der Kreuzreaktion zwischen

den Antikörpern gegen die exogenen gonadotropen Hormone und den endogenen Gonadotropinen zugeschrieben (FAULKNER et al., 1975).

2.3.2.3 Schweine

Die wiederholte Applikation gonadotroper Hormone an das gleiche Tier ist bei dieser Spezies nur unter biotechnischen Aspekten vermehrt in Betracht zu ziehen. Mehrfach wurde schon untersucht, ob durch PMSG- und/oder HCG-Applikation eine Steigerung der Wurfgröße möglich ist. Die beobachteten Ergebnisse sind widersprüchlich. AHRENS und SCHLEGEL (1978) und POLANCO et al. (1980) berichteten über eine Verbesserung der Wurfleistung der Sauen auch nach wiederholter Verabreichung von Hormonen in aufeinander folgenden Würfen. Demgegenüber stellten BOSTEDT (1979), BOSTEDT et al. (1978) und SCHUMM et al. (1979) nach der dritten Behandlungsperiode eine deutliche Depression in der Wurfgröße fest und brachten dies mit einer evtl. Entstehung von Antikörpern in Zusammenhang. Wenn eine solche Antikörperbildung durch PMSG und HCG in therapeutischen Dosen beim Schwein auftritt, muß in Einzelfällen nach wiederholter Applikation auch bei anderen Indikationen, wie beispielsweise Zyklusinduktion, Brunst- und Ovulationssynchronisation oder das Induzieren von Superovulationen (SCHLEGEL und STENZEL, 1978; SCHLEGEL et al., 1978 a, b; WEBSTER, 1978; HURTGEN und LEMAN, 1979), mit einer Minderung des Therapieerfolges gerechnet werden.

2.3.2.4 Kleine Wiederkäuer

Beim kleinen Wiederkäuer, und hier besonders beim Schaf, gelten die gleichen Voraussetzungen wie beim Schwein, d.h. daß der Einsatz von Hormonen die Rentabilität durch Intensivierung der Reproduktion fördern soll. Die Applikation der Wirkstoffe erfolgt vorwiegend unter biotechnischen Gesichtspunkten, da diagnostische Schwierigkeiten und wirtschaftliche Gründe den therapeutischen Einsatz begrenzen.

Mit der Frage einer Antikörperbildung gegen PMSG beschäftigten sich PIGON et al. (1960). Die Applikationsart, in dieser Arbeit s.c. und i.v., übte keinen Einfluß auf die Höhe des Antikörpertiters aus, während nach der Verabreichung einer kleinen Dosis von 200 IE zweimal pro Woche die Immunantwort bereits nach zwei Wochen zu erkennen war. Nach der zweimaligen Applikation von 500 IE bzw. 1000 IE pro Woche waren die Antikörper erst nach drei bzw. fünf Wochen nachweisbar. An den Ovarien der mit höheren PMSG-Dosen behandelteten Schafe wurden als Folgereaktion der Antikörperbildung nur kleine Follikel und keine Corpora lutea festgestellt. Außerdem soll PMSG gegenüber HCG in Bezug auf Zeitpunkt und Höhe der Antikörperbildung für Wiederkäuer das stärkere Immunogen sein (PIGON et al., 1960). Die Tatsache, daß PMSG-spezifische Antikörper die biologische Wirksamkeit dieses Hormons aufheben, sahen BINDON und PIPER (1977) als Möglichkeit der Kontrolle von PMSG- induzierten Ovulationen und Superovulationen an, um eine zu starke Stimulation der Follikelentwicklung zu verhindern.

Da die wiederholte therapeutische Anwendung dieser Hormone in praxi aufgrund der Indikationsgebiete relativ selten induziert ist, muß bei biotechnischen Fragestellungen, wie Brunstinduktion, -synchronisation und Stimulierung der Ovaraktivität (BENTHIN und RÖSTEL, 1978; BOSTEDT, 1979; WHYMAN et al., 1979; RHIND et al., 1980), die Gefahr einer Antikörperbildung wohl verstärkt in Erwägung gezogen werden.

2.3.2.5 Rinder

Für eine hormonelle Behandlung sind bei dieser Spezies ebenfalls die zwei Indikationsmöglichkeiten Therapie und biotechnische Maßnahme gegeben (Tabelle 2). Aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung des Einzeltieres ist eine wiederholte Anwendung der gonadotropen Hormone unter beiden Gesichtspunkten häufiger möglich als bei den bisher besprochenen Tierarten.

Großen Raum nehmen bei dieser Spezies die Studien über ein Nachlassen der Hormonwirkung, bzw. die Ausbildung von spezifischen Antikörpern, ein. Zunächst einmal gilt festzustellen, daß die Antikörper, die nach einer Immunisierung mit HCG oder PMSG unter Adjuvanszusatz bei Tieren, wie Rindern und Kaninchen u.a., gefunden wurden, im Stande sind, sowohl in vitro eine präzipitierende Wirkung als auch in vivo eine Neutralisation der biologischen Wirksamkeit der Hormone zu bewirken (OHMS, 1961; NAKAHARA et al., 1964).

So soll die Ovulationsrate bei Superovulationen nach aufeinanderfolgenden PMSG- oder HCG-Behandlungen abfallende Tendenzen zeigen (WILLETT et al., 1953; LASTER et al., 1971; SAUMANDE et al., 1978; NEWCOMB et al., 1979; LUBBADEH et al., 1980). Diese Beobachtungen trafen für Kalbinnen und Kühe gleichermaßen zu (NEWCOMB et al., 1979). NEWCOMB et al. (1979) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß die Ovulationsrate zwar nach der zweiten Injektion signifikant abfiel, doch die Anzahl der gebildeten Follikel unbeeinflußt blieb, und sich das Verhältnis der Follikel (Anzahl der Follikel/Anzahl der Ovulationen + Anzahl der Follikel mit einem Durchmesser $>$ 10 mm) signifikant erhöhte. Da die Dosis (1000 IE und 2000 IE PMSG) auf das Verhältnis der Follikel keinen Einfluß ausübte, kann die verminderte Ovulationsrate nicht auf einen Anstieg der Zahl der nicht ovulierten Follikel zurückgehen, sondern z.B. auf eine Antikörperbildung gegen PMSG. SAUMANDE et al. (1978) diskutierten als mögliche Ursachen einer reduzierten Ovulationsrate ebenfalls eine Antikörperbildung, die jedoch im Radioimmunoassay nicht bestätigt werden konnte. Untersuchungen über saisonale Einflüsse zeigten, unabhängig vom Monat der Hormonbehandlung, ebenfalls einen Abfall in der Ovulationsrate. Im allgemeinen wurden in den Monaten Februar - April und Juli - August vermehrt Ovulationen beobachtet. Als dritte Möglichkeit wurde noch eine Erschöpfung der Ovarien in Erwägung gezogen. In anderen Arbeiten (HAFEZ et al., 1964; JAINUDEEN et al., 1966) wurde nach einer einmaligen PMSG-Applikation (1500 IE bzw. 2000 IE PMSG) von einer völlig fehlenden Reaktion der Ovarien auf das

Hormon berichtet, wogegen die endogenen oder artfremden Gonadotropine in ihrer Wirksamkeit unbeeinflußt blieben (HAFEZ et al., 1964; JAINUDEEN et al., 1966).

Als Ursache wurde aber auch die Enstehung von spezifischen Antikörpern gegen die exogenen Gonadotropine diskutiert (WILLETT et al., 1953; JAINUDEEN et al., 1966; YAMAUCHI, 1970). Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, daß mit ansteigender Hormondosis höhere Titer beobachtet wurden (WILLETT et al., 1953; COLE et al., 1957). Demgegenüber hält PAPKOFF (1978) diese Erklärung der Immunität gegen die FSH- oder LH- Untereinheit von PMSG für ziemlich unwahrscheinlich, da die ß-Untereinheit dieses Moleküls für die spezifische biologische Aktivität verantwortlich ist. Diese Einheit kann im Gegensatz zur α-Subunit mit anderen Gonadotropinen nicht verbunden werden. Wird die α-Untereinheit von PMSG beispielsweise mit ß-oLH, ß-oFSH oder ß-HCG verbunden, besitzt das ganze Molekül die Eigenschaften von oLH, oFSH oder HCG.

Die Ausbildung von spezifischen Antikörpern als Reaktion auf wiederholte Gonadotropininjektionen kann nur schwer als Begründung für eine reduzierte Ovarantwort aufrecht erhalten werden, da Berichte existieren, in denen eine Antikörperbildung nach einer normal dosierten, d.h. therapeutischen, PMSG-Menge für unwahrscheinlich gehalten wird (COLE et al., 1957; NAKAHARA et al., 1961 a, b; NAKAHARA et al., 1965; SCHAMS et al., 1978; FUNG, 1979; LEIDL et al., 1980; LUBBADEH et al., 1980). Von SCHAMS et al. (1978) wird es sogar für ziemlich schwierig gehalten, beim Rind Antikörper gegen PMSG zu er-

zeugen. Dies dürfte vermutlich mit der Tatsache zusammenhängen, daß das Rind als relativ schlechter Antikörperbildner gilt (COLE et al., 1957; JAINUDEEN et al., 1966). Eine andere Erklärung über den eintretenden Wirkungsverlust des Hormons wurde von LUBBADEH et al. (1980) gegeben. Bei der Induktion von Superovulationen über vier fortlaufende Zyklen hinweg waren die Ergebnisse nach der ersten und vierten Behandlung sehr ähnlich, während nach der zweiten und dritten geringe Rückgänge in der Zahl der Ovulationen zu verzeichnen waren. Als Ursache wird der kurze Abstand zwischen Embryogewinnung und erneuter Gonadotropinapplikation genannt, der für eine Follikelreifung nicht ausreichend war.

Oft wurde auch die Frage aufgeworfen, ob die gebildeten Antikörper gegen das Hormon oder gegen irgendwelche Begleitstoffe gerichtet sind. COLE et al. (1957) konnten in ihren Versuchen zeigen, daß die gebildeten Antikörper doch mehr gegen das Hormon als gegen die Begleitstoffe gebildet wurden. Auch von anderer Seite (MAYR und BIBRACK, 1969; FUNG, 1979; LEIDL et al., 1980) wird die Möglichkeit einer Beeinflussung der Immunantwort durch gewisse Begleitstoffe in Erwägung gezogen. Sie ist bisher nur im Zusammenhang mit Antibiotikaallergien nachgewiesen worden (MAYR und BIBRACK, 1969).

Andere Versuche zeigten, daß sogar hitzeinaktiviertes HCG im Stande ist, eine spezifische Antikörperbildung zu induzieren, die jedoch früher nachweisbar war und eine geringere Wirksamkeit als nach HCG-Verabreichung besaß (NAKAHARA et al., 1964; YAMAUCHI, 1970).

An Rindern wurden ähnliche Beobachtungen wie an Schweinen gemacht, nämlich das Ausbleiben von Superovulationen nach der simultanen Injektion von PMSG und PMSG-Antiserum. Die Applikation von PMSG-Antiserum könnte eine Möglichkeit sein, Superovulationen beim Rind besser zu steuern, d.h. die PMSG-Wirkung zu einem bestimmten Zeitpunkt zu unterbrechen, wodurch eine unerwünschte, sich über lange Zeit erstreckende Stimulierung von Follikeln vermieden wird, und ein verkürzter Östrus resultieren könnte (DHONDT et al., 1978).

2.3.2.6 Pferde

Versuche, das Follikelwachstum oder Superovulationen beim Pferd mit Anöstrie oder auch mit normalem Zyklusverlauf durch PMSG-Applikation, ähnlich den anderen Tierarten, zu stimulieren, sind immer fehlgeschlagen. Dies wurde dadurch erklärt, daß es im Ovar des Pferdes keine PMSG-spezifischen Rezeptoren gibt, und die Bindung von diesem Hormon an die FSH-Rezeptoren unerheblich ist, zum anderen aber die PMSG-Bindung an die LH-Rezeptoren nur ein Zehntel der Affinität von LH-Rezeptoren von anderen Spezies beträgt. Zudem können die LH-Rezeptoren zwischen LH und HCG einerseits und PMSG auf der anderen Seite unterscheiden (STEWART und ALLEN, 1979).

Das gonadotrope Hormon HCG findet bei Stuten seinen überwiegenden Einsatz zur Steuerung der Ovulation, wie beispielsweise Östrusverkürzung oder Vorverlegung des Ovulationszeitpunkts (LOY und HUGHES, 1966; SULLIVAN et al., 1973; PALMER und JOUSSET, 1975; DUBOSE et al., 1979; IRVINE und EVANS, 1979), um

z.B. die Anzahl der Inseminationen oder Bedeckungen pro Östrus zu reduzieren. Die Abfohlrate blieb von dieser Behandlung unbeeinflußt (LOY und HUGHES, 1966; SULLIVAN et al., 1973; VOSS et al., 1975). Wurde diese Behandlungsmethode über mehrere Zyklen hinweg fortgesetzt, zeigte sich keine nachteilige Beeinflussung der folgenden Östren oder Graviditäten (LOY und HUGHES, 1966). Selbst auf tägliche intramuskuläre Applikationen von 2000 IE bzw. 3000 IE HCG über 16 Tage reagierten die Stuten auf eine spätere ovulationsauslösende HCG-Injektion unverändert. Demzufolge wurde es ausgeschlossen, daß durch die Verabreichung von therapeutischen HCG-Dosen eine Resistenzbildung ausgelöst werden kann, ja es schien schwierig oder gar unmöglich zu sein, anaphylaktische Reaktionen unter extremen Bedingungen (HCG + Adjuvans) auszulösen (LOY und HUGHES, 1966).

Im Gegensatz dazu stehen die Berichte von SULLIVAN et al. (1973) und VOSS et al. (1975), die Stuten über drei fortlaufende Zyklen mit 2000 IE HCG am zweiten Östrustag behandelten. Nach der ersten Behandlung war der Östrus signifikant verkürzt, und die Ovulation trat zu einem früheren Zeitpunkt ein. Im zweiten beobachteten Zyklus konnte in Bezug auf beide Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren festgestellt werden. Die dritte Behandlung führte zu einem verlängerten Östrus, einer verzögerten oder teilweise sogar ausbleibenden Ovulation. Von diesen Autoren wurden immunologische Vorgänge mit den Veränderungen nach der dritten Hormoninjektion, d.h. eine Neutralisation der Hormonwirkung durch Antikörper, in Zusammenhang gebracht, aber nicht weiter

untersucht (PINEDA et al., 1972; SULLIVAN et al., 1973; VOSS et al., 1975). Dagegen konnten COLE et al. (1975) zeigen, daß wöchentliche Injektionen von 6000 IE HCG bei Stuten eine spezifische Antikörperbildung provozierten. ROSER et al. (1979) konnten dies ebenfalls demonstrieren, aber auch, daß die Antikörper nicht als Ursache für Ovulationsstörungen in Frage kommen. Fünf von zwölf behandelten Stuten (2644 IE/Zyklus i.v.) wiesen nach zwei bis fünf Behandlungen signifikante Antikörpertiter gegen HCG auf, deren Halbwertzeit 30 Tage bis zu mehreren Monaten betrug. Weiterhin konnte in diesen Versuchen im Einklang zu einer Arbeit an Hunden (AL-KAFAWI et al., 1974) keine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern und dem endogenen LH in vitro beobachtet werden. Besonders interessant erscheint die Tatsache, daß den Tieren jeweils 2644 IE HCG pro Zyklus appliziert wurden, die Gesamtzahl der Antikörper, die von fünf Pferden gebildet wurden, aber 4756 bis 45240 IE HCG binden könnten. Eine Reduzierung oder gar Aufhebung der biologischen Wirksamkeit von HCG blieb in diesen Versuchen trotz der hohen Antikörpertiter aus und wurde dadurch erklärt, daß die Antikörper nur die antigenen Stellen des Hormonmoleküls beeinflussen, während die biologisch aktiven Bezirke ungehindert mit den Rezeptoren des Ovars reagieren können (ROSER et al., 1979).

Trotz dieser sehr divergierenden Ergebnisse scheint es angebracht zu sein, HCG in der Pferdepraxis mit Vorsicht und nur bei Stuten anzuwenden, bei denen ein LH-Mangel vorzuliegen scheint (IRVINE und EVANS, 1979).

2.4 Art der Immunreaktion

2.4.1 Normaler Verlauf der Immunreaktion

Die Induktion einer Immunantwort erfolgt durch den Kontakt zwischen Organismus und Antigen und läßt sich in zwei Typen einteilen:

1. die zelluläre Immunantwort
2. die humorale Immunantwort

Die gemeinsame Basis beider Arten der Immunität bilden die immunkompetenten Zellen, die sich aus multipotenten lympho-hämopoetischen Ursprungszellen (Knochenmarksstammzellen) entwickelt haben; die weitere Differenzierung kann auf zweierlei Wegen geschehen: Ein Teil der Stammzellen bildet sich im Thymus zu den sog. T-Lymphozyten um, die für die zellgebundene Immunantwort verantwortlich sind, um dann in die sekundären Lymphorgane zu gelangen. Der zweite Weg der Stammzellen führt über die Bursa fabricii der Vögel, bzw. das Bursaäquivalent der anderen Tiere, wo sie sich in die sog. B-Lymphozyten differenzieren, ebenfalls in die peripheren lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Milz und Schleimhäute (ROLLE und MAYR, 1978; MIELKE, 1979).

Im Anschluß an eine Immunisierung kann es zur Bildung von "Gedächtniszellen" kommen, durch die das sensibilisierte Individuum in der Lage ist, nach einem Sekundärkontakt mit demselben Antigen schneller und auch stärker zu reagieren (CRIEP, 1969; CLAMAN, 1970; SELL, 1977; ROLLE und MAYR, 1978; MIELKE, 1979). Bei diesen "memory cells" handelt es sich um kleine

Lymphozyten, die sowohl im Laufe einer zellulären als auch einer humoralen Abwehrreaktion gebildet werden und vorwiegend in Milz und Lymphknoten lokalisiert sind. Nach einem Kontakt zwischen den B-Lymphozyten und dem Antigen entstehen die antikörperbildenden Plasmazellen und damit verschiedene Immunglobuline, die bei jedem warmblütigen Tier eine heterogene Population aus verschiedenen Immunglobulinklassen und -subklassen darstellt. Die Antikörperproduktion findet vor allem in Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Schleimhäuten statt und läßt sich in drei Phasen unterteilen (ROLLE und MAYR, 1978):

1. Adaptations- oder Präinduktionsphase
2. Induktionsphase
3. Produktionsphase

Die Antikörper, auch aufgrund ihrer Entstehung als Immunglobuline bezeichnet, gehören zur Klasse der Plasma- oder Serumglobuline und lassen sich in die fünf Hauptklassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE einteilen. Ihrer Struktur nach bestehen sie aus zwei, über Disulfidbrücken zusammengeknüpften Paaren von Polypeptidketten, zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten (CATHOU, 1978; MIELKE, 1979).

Während die leichten Ketten den Immunglobulinen verschiedener Klassen gemeinsam sind und nach ihren antigenen Eigenschaften in zwei Subklassen unterteilt werden, zeigen die schweren Ketten deutliche strukturelle und antigene Unterschiede, die zu der Einteilung in vier Subklassen führen und die besonderen antigenen Eigenschaften jeder Immunglobulinklasse bedin-

gen. Von den verschiedenen Immunglobulinklassen besitzen IgG und IgM immunologisch die größte Bedeutung. Nach einem Primärkontakt zwischen dem Antigen und dem Organismus kommt es nach ca. drei bis vier Tagen zu einem logarithmischen Anstieg der Antikörper des IgM-Typs, der am siebten Tag seinen Maximaltiter erreicht. Ab diesem Zeitpunkt treten vorwiegend IgG auf, ebenfalls mit logarithmischem Anstieg bei ausreichender Antigendosis und einem deutlichen Titer ca. ab der zweiten Woche, abhängig von Art und Dosis des Antigens, aber auch von der Art der Nachweismethode (JÄGER, 1976; SELL, 1977). Nach einem zweiten Kontakt zwischen dem Organismus und dem gleichen Antigen tritt in der Reaktion der IgM kein Unterschied auf, indessen setzt die Produktion der IgG früher ein, und der Maximaltiter erreicht das 10^2 bis 10^3-fache des Titers gegenüber der Primärantwort; dieser Immunglobulintyp ist dadurch für eine definitive, belastbare und länger anhaltende Immunantwort verantwortlich (CLAMAN, 1970; JÄGER, 1976). Diese unterschiedliche Reaktion ist auf die Existenz der Gedächtniszellen zurückzuführen. Die IgM treten also gegenüber der IgG-Klasse früher auf und sind durch ihre fünf bis zehn reaktiven Bezirke sehr reaktionsfähig.

Gegenüber den Serumglobulinen IgG und IgM kommt IgA vor allem in den Sekreten auf den Schleimhäuten des Körpers, wie u.a. Speichel, Tränenflüssigkeit, Nasen- oder Gastrointestinalsekreten, vor und stellt den wichtigsten spezifischen Schutzmechanismus der Schleimhaut dar. Gebildet werden sie von den Plasmazellen, die sich in Mukosa- oder Epithelnähe von Drüsen befinden.

Eine besondere Immunglobulinklasse stellt IgE dar, das vorwiegend in respiratorischer und gastrointestinaler Mukosa und regionalen Lymphknoten synthetisiert wird und an anaphylaktischen Reaktionen durch die Freisetzung von Histamin aus den Zielzellen und durch die Stimulierung der "slow-reacting-substance" und einem chemotaktischen Faktor der eosinophilen Zellen beteiligt ist (CATHOU, 1978).

IgD wurde bisher nur beim Menschen und kleinen Versuchstieren in geringen Serumkonzentrationen festgestellt, ohne daß deren Funktion geklärt werden konnte, obwohl immer mehr dafür spricht, daß diese Immunglobuline gegen permanent vorhandene Antigene gerichtet sind (CATHOU, 1978).

Die wichtigsten Antikörpereigenschaften beruhen auf den Strukturen des variablen und konstanten Teils der H- und L-Ketten des Ig-Moleküls und auf ihrer Spezifität und Affinität gegenüber dem entsprechenden Antigen. Als weitere Faktoren für die Bindungsintensität zwischen einem Antigen und Antikörper kommen Affinität und Avidität der Antikörper in Betracht, wobei beide Eigenschaften bei den frühzeitig gebildeten Antikörpern schwächer ausgeprägt sind (STEFFEN, 1968; SELL, 1977; ROLLE und MAYR, 1978). In diesem Zusammenhang sei nochmals auf Kapitel 2.3 verwiesen.

2.4.2 Pathologische Folgen der Immunreaktion

Da eine Antikörperbildung nach einer Gonadotropintherapie nicht ausgeschlossen werden kann, ist es möglich, daß ein mehrmaliger Antigenkontakt bei einem sensibilisierten Individuum nicht nur zu einer Boosterung, sondern auch zu einer schädlichen Wirkung von Immunreaktionen, sprich Hypersensivität oder Allergie führt. Die Einteilung der Allergien wird wie folgt vorgenommen (GELL und COOMBS, 1968):

Typ I : Anaphylaktische Reaktionen durch Reagine (IgE)

Typ II : Zytotoxische Reaktionen

Typ III: Durch Immunkomplexe bedingte Reaktionen (Arthus-Reaktion; Serumkrankheit)

Typ IV : Reaktionen vom verzögerten Typ (zellulär bedingte Oberempfindlichkeitsreaktionen)

Auch für das Zustandekommen von Allergien sind Parameter wie Antigendosis, Ort des Kontaktes mit dem Antigen, Häufigkeit sowie Zeitintervall zwischen den Antigenapplikationen, Speziesunterschiede in der Reaktionsbereitschaft und dem entsprechenden Schockorgan von Bedeutung und den entsprechenden Kapiteln (2.3.1 und 2.4.1) zu entnehmen.

Anaphylaxie (Typ I)

Nach Art der Erzeugung können anaphylaktische Reaktionen zum einen durch aktive Sensibilisierung des Organismus mit einem bestimmten Antigen, zum anderen durch Verabreichung von Antikörpern passiv ausgelöst werden, beruhen aber immer auf dem

Vorhandensein von IgE-Antikörpern gegen das Antigen. In beiden Fällen kann, in Abhängigkeit von der angewandten Methodik, eine System- oder Lokalreaktion provoziert werden. So wird beispielsweise beim Meerschweinchen durch die wiederholte Injektion von Eialbumin im Abstand von zwei bis drei Wochen ein anaphylaktischer Schock ausgelöst, der innerhalb von zwei bis fünf Minuten zum Erstickungstod führt. Ähnliche Reaktionen wurden beim Menschen nach mehrfachen Insektenstichen oder Penicillininjektionen beobachtet (ISHIZAKA und KIND, 1970: ROITT, 1977).

Bei den verschiedenen Tierarten zeichnen sich unterschiedliche Organe, als Schockorgan bezeichnet, durch eine besondere Reaktionsbereitschaft aus, beispielsweise beim Meerschweinchen die glatte Muskulatur der Bronchien, beim Hund die glatte Muskulatur der Leber (CRIEP, 1969; ISHIZAKA und KIND, 1970) oder die glatte Muskulatur der Lunge beim Rind (AITKEN und SANFORD, 1969).

Eine Lokalreaktion entsteht dann, wenn im Anschluß an die erste sensibilisierende Antigeninjektion die reaktionsauslösende Antigenapplikation lokal, d.h. vorwiegend intrakutan, erfolgt. Auch hier werden durch die Freisetzung von Histamin sowie anderer Mediatoren typische Symptome, wie Quaddeln und Erytheme, hervorgerufen. Mit Hilfe des aktiven kutanen Anaphylaxietests an HCG-sensibilisierten Rindern konnten neben lokalen Reaktionen bei einigen Tieren Systemreaktionen -Juckreiz an Augenlidern, Nase, Vulva und Anus, Ödeme an Konjunktival- und Vestibularschleimhaut sowie Tränen- und Speichelsekretion- beobachtet werden (FUNG, 1979). Vollständigkeitshalber seien noch

Asthma und Heuschnupfen des Menschen erwähnt. Hier werden die Reagine, mit hoher Gewebebindungsfähigkeit, lokal nach dem ersten Antigenkontakt gebildet.

Zytotoxische Allergie (Typ II)

Bei dieser Allergieform reagieren Antikörper mit spezifischen Antigendeterminanten an Zelloberfläche oder Zellinneren und mit nicht zellulären Gewebselementen wie Kollagen. Durch Veränderung der elektrischen Ladung an der Zelloberfläche oder durch Aktivierung der Komplementkaskade wird die Phagozytose erleichtert. Aber auch der Zelltod kann durch die Zellmembran schädigende Aktivierung des gesamten Komplementsystems (C_1 - C_9) ausgelöst werden (ROITT, 1977). Dieser Vorgang liegt immunhämatologischen Krankheiten zugrunde (STEFFEN, 1968; SELL, 1977).

Allergie durch Immunkomplexe (Typ III)

Die hier erwähnten Allergietypen, Arthus Phänomen und Serumkrankheit werden durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen hervorgerufen.

Das Arthus Phänomen stellt eine lokale pathologische Immunreaktion dar und geht auf die Beobachtung von Arthus zurück. Er berichtete von einer ödematösen, erythematösen und nekrotischen lokalen Hautveränderung, nachdem einem immunisierten Kaninchen das gleiche Antigen subkutan verabreicht worden war (CRIEP, 1969). Diese Reaktion beruht auf einer lokalen Präzi-

pitatbildung zwischen Antigen und Antikörper an der Basalmembran von Gefäßen, infolge deren eine Endothelschädigung erfolgt (ISHIZAKA und KIND, 1970). Neben der Komplementbildung kommt es zur Infiltration polymorphkerniger Granulozyten, die durch die Freisetzung ihrer lysosomalen Enzyme (Lysozyme) die Phagozytose und Katabolisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe bewirken (CRIEP, 1969). Dies wird durch Hämorrhagie, Thrombose und Nekrose des Gewebes deutlich. Nach zwei bis drei Tagen wandern mononukleäre Zellen ein und bewirken eine Anhäufung von Plasmazellen, die wahrscheinlich ebenfalls bei der Katabolisierung des Antigens eine Rolle spielen (CRIEP, 1969).

Im Gegensatz zu anderen Immunkrankheiten ist bei der Serumkrankheit die Besonderheit, daß eine Sensibilisierung des Organsimus nicht vorausgesetzt wird. Diese Krankheit tritt ein bis zwei Wochen nach der Injektion einer relativ hohen Dosis fremden Serums auf und äußert sich in Form von Temperaturanstieg, geschwollenen Lymphknoten, generalisiertem Hautausschlag, schmerzhafter Arthritis, Leukopenie u.a., ebenfalls durch die Präzipitatbildung zwischen Antigen und Antikörper ausgelöst, induziert durch den Antigenüberschuß (ROITT, 1977). Die Pathogenese entspricht derjenigen des Arthus Phänomens (ISHIZAKA und KIND, 1970). Diese Krankheit kann aber auch durch die Injektion von Depotarzneimitteln ausgelöst werden; damit könnte dieses Krankheitsbild theoretisch auch bei hormonbehandelten Tieren auftreten, bedingt durch die lange Halbwertzeit von PMSG und HCG.

Zelluläre Allergie vom verzögerten Typ (Typ IV)

Diese Form der Überempfindlichkeit vom Spättyp kann durch eine Vielzahl verschiedenartigster Antigene ausgelöst werden; zu den Mikroben sind Bakterien, Viren und Pilze zu zählen, aber auch gereinigte oder konjugierte Proteine, Polysaccharide und Gewebsantigene sind als auslösende Faktoren in Betracht zu ziehen. Die 8-48 Stunden nach der reaktionsauslösenden Antigenapplikation auftretenden Symptome können allmeiner oder lokaler Natur sein (STEFFEN, 1968).

Typisch für diese Art der Allergie ist die intradermale Tuberkulinprobe, die bei tuberkulös erkrankten Tieren eine lokale Hautreaktion auslöst. Sechs bis acht Stunden nach der intradermalen Injektion von Tuberkulin zeigt sich Hautdickenzunahme, Erythembildung mit Induration, die nach 24-48 Stunden ihr Maximum erreicht, um dann nicht immer in Nekrose des Reaktionsznetrums überzugehen. Unabhängig vom Ort der Reaktion ist eine gemeinsame morphologische Basis zu erkennen, bei der es zunächst zu einer charakteristischen perivaskulären Ansammlung und Akkumulation mononukleärer, dann mononukleärer und polymorphkerniger Zellen kommt. Schließlich besteht das Infiltrat nur noch aus Lymphozyten und Makrophagen (ISHIZAKA und KIND, 1970; ROITT, 1977). Das Antigen kann mit Makrophagen verbunden sein, um mit den Rezeptoren auf der T-Lymphozytenoberfläche einen Komplex zu bilden, der die Lymphozytentransformation, die Freisetzung von Mediatoren, sog. "Lymphokinine", und zytotoxische Effekte bewirkt (JÄGER, 1976).

In diesem Zusammenhang ist die inhibitorische Wirkung von HCG auf die zelluläre Immunität zu erwähnen (HAN, 1975; CARTER, 1976; FABRIS und PIANTANELLI, 1976). Dies konnte sowohl in vivo durch Hauttests an immunisierten Meerschweinchen, als auch in vitro an Lymphozytenzellkulturen nachgewiesen werden. Die Immunsuppression in vivo blieb über drei Wochen bestehen und wird durch eine Hemmung der Lymphozytenblastogenese erklärt. Die Vorgänge in vitro konnten noch nicht geklärt werden, es wird aber als Möglichkeit ein Wetteifern zwischen HCG und, in diesen Versuchen verwendeten, Phythämagglutinin um die Determinanten der Immunzellen in Erwägung gezogen (HAN, 1975; CARTER, 1976).

Die hemmende Wirkung von HCG auf die humorale Immunität konnte in Mäuseversuchen beobachtet werden. Der Mechanismus ist noch unbekannt, doch es wird angenommen, daß HCG die Lymphozytengenese verlängert und somit die Produktion der immunologisch aktivierten Zellen hemmt (YOUNGER et al., 1969).

Außer diesen allergischen Immunantworten gibt es noch die anaphylaktoiden Reaktionen mit dem Unterschied, daß bei diesen eine vorherige Sensibilisierung, d.h. die Anwesenheit von Antikörpern gegen das Antigen, entfällt (CRIEP, 1969; ROLLE und MAYR, 1978). Die hier auftretenden Symptome entsprechen denjenigen der echten Allergie und zählen nach dem Wirkungsmechanismus zu den toxischen Reaktionen, die mit der Histaminfreisetzung und der mechanischen oder enzymatischen Zerstörung der Mastzellen einhergehen.

Eventuell auftretende Folgereaktionen

Neben der Gefahr der Allergie besteht aber auch die Möglichkeit des Auftretens von Immunreaktionen. Die Wirksamkeit der wiederholt applizierten Hormone wird durch spezifische, vom Organismus gebildete, Antikörper aufgehoben. Die Mechanismen dieser immunbiologischen Neutralisation oder Inaktivierung von Hormonen, Enzymen oder sonstigen biologisch aktiven Substanzen läßt sich nach SELL (1977) in zwei Kategorien einteilen:

1. Die direkte Inaktivierung, indem die Antikörper mit dem sog. biologisch aktiven Teil des Hormonmoleküls oder einer Gruppierung in dessen Nähe reagieren. Meistens jedoch verbinden sich die Antikörper mit den antigenen Determinanten des Hormons, wodurch dessen Tertiärstruktur verändert wird. Dadurch wird das Hormon für die entsprechenden Rezeptoren unerkennbar. An Enzymen wurde festgestellt, daß Reaktionen dieser Art nicht immer zu einer Inaktivierung des Moleküls führen müssen.
2. Bei der indirekten Inaktivierung führt die Wechselbeziehung zwischen Hormon und Antikörper zur schnelleren Katabolisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes, wodurch die effektive Hormonkonzentration reduziert wird.

Auch diese Reaktionen variieren zwischen den Tierarten und stehen in enger Beziehung mit den Eigenschaften von Antigen und Antikörper.

Als erstes wurde dieses Phänomen einer Hormonneutralisa-

tion beim Menschen nach einer Insulintherapie bemerkt, betrifft aber auch das Wachstumshormon und das adrenocorticotrophe Hormon (LEATHEM, 1944; BREUER und NIESCHLAG, 1975). Die Inaktivirung von HCG konnte in vitro anhand des Präzipitationstests und in vivo mittels Bioassay an Ratten nachgewiesen werden (OHMS, 1961; LUNENFELD et al., 1962; PETRUSZ et al., 1971). An Kaninchen, Mäusen, Schafen und Kühen konnte nach mehrmaligen PMSG- oder HCG-Injektionen in superovulatorischen Dosen ein progressiver Abfall in der Zahl der Ovulationen und der Corpora-lutea-Bildung festgestellt werden. Mäuse und Kaninchen zeigten nach wiederholter Gonadotropinbehandlung keine Ovulationen mehr, zurückgeführt auf spezifische Antikörper gegen diese Fremdproteine, während die Tiere sowohl auf andere heterologe als auch auf endogene Gonadotropine sensibel blieben (JAINUDEEN et al., 1966; REEL et al., 1976; LUBBADEH et al., 1980). Auch WILLETT et al. (1953) berichteten von gleichen Versuchsergebnissen nach superovulatorischer PMSG- und HCG-Verabreichung an Kühe, doch wurde für den zahlenmäßigen Abfall der Corpora lutea neben der oben genannten Ursache eine Erschöpfung der Primärfollikel, verschiedene Grade einer Verletzung des Ovars durch die Behandlung oder Operation zur Corpora lutea-Zählung in Erwägung gezogen. Nachdem dieses Phänomen der Resistenzbildung auch nach Ovarialzystenbehandlungen an Kühen mit HCG beobachtet wurde, konnte dennoch eine Heilung erzielt werden, indem HCG in die Zysten direkt appliziert wurde (NAKAHARA et al., 1961 b, 1961 c; YAMAUCHI, 1970).

Auch an Pferden wurden Versuche mit HCG-Injektionen während des Östrus durchgeführt, da eine Östrusverkürzung oder höhere Ovulationsrate die Anzahl der künstlichen Befruchtungen oder der Bedeckungen senken würde, und außerdem eine Synchronisation von Ovulation und Geburt erreicht wird. Einerseits wurden nach einer Hormonbehandlung über zwei oder mehr aufeinanderfolgenden Östren keine Antikörper gefunden (LOY und HUGHES, 1966), andererseits wurde nach der dritten HCG-Applikation eine Resistenz gegen das Hormon festgestellt. Es wurden immunologische Vorgänge damit in Zusammenhang gebracht, ohne allerdings nach Antikörpern zu suchen (SULLIVAN et al., 1973). In diesem Zusammenhang sei auf Kapitel 2.3.2 verwiesen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Material

Für die Untersuchungen wurden folgende Präparate verwendet:

1. Intergonan^{R} (Vemie, Kempen)
   1000 IE PMSG/Ampulle
2. Suigonan^{R} (Vemie, Kempen)
   400 IE PMSG und 200 IE HCG/Ampulle
3. Ekluton^{R} (Vemie, Kempen)
   1500 IE HCG/Ampulle
4. Anteron^{R} (Schering A.G., Berlin/Berghamen)
   1000 IE PMSG/Ampulle
5. Primogonyl^{R} (Schering A.G., Berlin/Berghamen)
   5000 IE HCG/Ampulle
6. Freund'sches Adjuvans komplett (FAC)
   (Behring Werke A.G., Leverkusen)
7. PMSG (Bayer A.G., Leverkusen)
   1290 IE/mg, lyophilisiert; in Reinsubstanz für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt
8. HCG (Bayer A.G., Leverkusen)
   3010 IE/mg, lyophilisiert; in Reinsubstanz für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt

9. Antiserum gegen Immunglobuline G von Schwein, Pferd, Schaf und Hund
(Miles Biochemicals GmbH, Frankfurt-Main)

Die Versuche wurden mit Anteron^{R} begonnen; da dieses Präparat nicht mehr geliefert werden konnte, wurde auf Intergonan^{R} gewechselt.

Die Untersuchungen am Schwein wurden mit PMSG-, PMSG/HCG- und HCG-Präparaten durchgeführt. Um eventuelle Unterschiede durch Präparate verschiedener Firmen auszuschließen, wurden sie von einer Firma bezogen.

3.1.2 Versuchstiere und Versuchsanordnung

Die Versuche wurden an Rindern, Schweinen, Pferden, Schafen und Hunden durchgeführt. Beim Rind wurde PMSG, beim Schwein PMSG, ein PMSG/HCG-Gemisch und HCG, bei Pferd, Schaf und Hund HCG eingesetzt.

3.1.2.1 Untersuchungen am Rind

Die Rinder stammten aus der Holstein-Friesian-Herde des Lehr-und Versuchsguts Oberschleißheim der Universität München. Es wurden zwei Gruppen mit je fünf Tieren in den Versuch einbezogen.

Gruppe I: 3 Bullen im Alter von 10-12 Monaten
2 Kühe im Alter von ca. 4 Jahren
Gruppe II: 3 Bullen im Alter von 7-8 Monaten
2 Kühe im Alter von 5 1/2 Jahren

Die Dosierung des PMSG wurde im Anklang an die bei der Superovulation verwendete Dosis auf 3000 IE festgesetzt. Die Tiere der Gruppe I bekamen einmal 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) intramuskulär verabreicht, während die Tiere der Gruppe II mit der gleichen Dosis nach 35 Tagen geboostert wurden.

Von allen Versuchstieren beider Gruppen wurden in 12-tägigen Abständen Blutproben durch Punktion der Vena jugularis entnommen, und zwar von Gruppe I dreimal und von Gruppe II fünfmal. Die erste Entnahme erfolgte vor der ersten Applikation des Hormonpräparates.

Sämtliche Blutproben, auch die der nachfolgend beschrie-

benen Versuche und die der immunisierten Tiere, wurden nach dem selben Schema weiterverarbeitet. Zunächst standen sie zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur, anschließend ca. 14 Stunden bei + 4°C. Sie wurden dann 30 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde in Plastikröhrchen abgekippt und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20°C gelagert.

Die Immunisierung mit PMSG und FAC, um hohe Antikörpertiter hervorzurufen, wurde an einer fünfjährigen Deutschen Fleckviehkuh durchgeführt. Das einheitliche Schema dieser Immunisierung ist für alle Tiere in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben.

3.1.2.2 Untersuchungen am Schwein

Für den Versuch standen 15 Deutsche Edelschweine, ebenfalls aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Universität München stammend, zur Verfügung, von denen ein Tier weiblich, die restlichen männliche Kastraten waren. Bei Versuchsbeginn lag ihr Körpergewicht bei 80-85 kg, bei Versuchsende nach ca. acht Wochen bei durchschnittlich 110 kg. Die Gruppeneinteilung erfolgte in jeweils fünf Tiere für ein zu testendes Hormonpräparat.

Gruppe I : PMSG-behandelte (Intergonan^{R}) Tiere. In dieser Gruppe befand sich das weibliche Tier

Gruppe II : PMSG/HCG-behandelte (Suigonan^{R}) Tiere

Gruppe III: HCG-behandelte (Ekluton^{R}) Tiere

Der Versuchsablauf gestaltete sich für die drei Gruppen einheitlich. Vor der ersten Injektion von 1000 IE PMSG (Gruppe I), 400 IE PMSG/200 IE HCG (Gruppe II) und 500 IE HCG (Gruppe III) wurde von allen Tieren die erste Blutprobe durch Punktion der Vena cava cranialis gewonnen. Nach 14 Tagen bekamen die Tiere die gleiche Dosis entsprechend ihrer Gruppe nochmals intramuskulär appliziert, nachdem unmittelbar zuvor die zweite Blutprobe genommen wurde. Zwei weitere Blutprobenentnahmen erfolgten im Abstand von 14 Tagen.

Die Immunisierung mit den Hormonen und FAC wurde für jedes Hormon an einem Ferkel der gleichen Rasse mit einem Gewicht von ca. 30 kg bei Versuchsbeginn vorgenommen. Das Schema der Immunisierung ist Kapitel 3.1.3.1 zu entnehmen.

3.1.2.3 Untersuchungen am Schaf

Die Untersuchungen wurden an sechs weiblichen Merino-Landschafen durchgeführt, deren Alter bei ca. drei Jahren lag. Auch hier wurde fünf Tieren im Abstand von 14 Tagen je 1500 IE HCG (Ekluton^{R}) intramuskulär injiziert. Die Blutproben wurden vor der ersten Injektion und dann im wöchentlichen Abstand über einen Zeitraum von sechs Wochen aus der Vena jugularis gewonnen.

Ein Tier diente dem Immunisierungsversuch mit HCG und FAC; nähere Angaben in Kapitel 3.1.3.1.

3.1.2.4 Untersuchungen am Pferd

Aus dem Stammgestüt Schwaiganger wurden für diesen Versuch fünf Bayerische Warmblutwallache im Alter von drei Jahren zur Verfügung gestellt. Alle Tiere erhielten zwei intramuskuläre Injektionen von je 3000 IE HCG (Ekluton^{R}) im Abstand von 14 Tagen. Die Reihenfolge der Blutprobengewinnung entsprach ohne Berücksichtigung der zweiten Injektion derjenigen der Schafe.

3.1.2.5 Untersuchungen am Hund

Es standen fünf Hunde, und zwar vier Dalmatiner, drei Rüden und eine Hündin, alle ca. vier Jahre alt und ein Pointerrüde im Alter von fünf Jahren, im HCG-Versuch. Diese Tiere bekamen jeweils 750 IE HCG (Ekluton^{R}) zweimal im Abstand von 14 Tagen intramuskulär appliziert. Die Blutproben wurden aus der Vena cervicalis superficialis entnommen. Der Zeitplan stimmte mit den Versuchen von Pferd und Schaf überein.

Zur Immunisierung mit dem Hormon und FAC wurde ein ca. fünfjähriger Schäferhundbastard herangezogen (siehe Kapitel 3.1.3.1).

3.1.3 Nachweis der Antikörper

3.1.3.1 Passiver Hämagglutinationstest

Immunserumherstellung

Eine Immunisierung mit dem Hormon und FAC der verschiedenen Tiere wie Kaninchen, Rind, Schwein, Schaf und Hund wurde vorgenommen, um für den passiven Hämagglutinationstest (PHA-Test) eine positive Kontrolle zu haben. Anhand der positiven und einer negativen Kontrolle wurden die zu testenden Seren vergleichsweise abgelesen. Die oben genannten Tiere wurden nach einem einheitlichen Schema immunisiert. Das HCG-Kontrollserum des Kaninchens stammte aus früheren Versuchen (FUNG, 1979). Vom Pferd konnte kein positives Kontrollserum gewonnen werden, weil dafür kein Versuchstier zur Verfügung stand. Zunächst soll das Schema der Immunisierung angegeben werden. Von den Kaninchen wurden für die PMSG-Gruppe und die PMSG/HCG-Gruppe je zwei Bastardkaninchen, von den restlichen oben genannten Tieren je ein Versuchstier herangezogen.

Von allen Versuchstieren wurde vor der ersten Injektion eine Blutprobe genommen, um den Ausgangstiter bestimmen zu können. Zur ersten Injektion wurde das in Solvens gelöste Hormon mit dem gleichen Volumen Freund'schen Adjuvans komplett emulgiert und den Tieren an zwei Stellen subkutan verabreicht, und zwar dem Kaninchen am Rücken, Rind und Schwein am Hals, dem Schaf zwischen Rumpf und Innenseite der Vorderextremität und dem Hund an der Schulter. Nach 14 Tagen wurde die intra-

venöse Boosterung mit der doppelten Hormonmenge vorgenommen und insgesamt dreimal im Abstand von sieben Tagen wiederholt. Zur Titerbestimmung wurde 14 Tage nach der letzten Applikation eine Blutprobe genommen. Die Kaninchen wurden dazu in Narkose (Ketanest^{R}: 0,345 ml/kg KG und Rompun^{R}: 0,1 ml/kg KG, s.c.) durch Herzpunktion entblutet. Bei den anderen Spezies wurden die Blutentnahmen bzw. intravenösen Injektionen an den hierfür üblichen Venen vorgenommen.

Der Immunisierungsplan ist in Tabelle 7 für die Kaninchen und in Tabelle 8 für Rind, Schwein, Schaf und Hund zusammengestellt.

Tab. 7: Übersicht über den Immunisierungsvorgang mit verschiedenen gonadotropen Hormonen beim Kaninchen

Zeitpunkt d. Appl.	Art d. Appl.	PMSG*	PMSG/HCG**
0. Tag	s.c.	1000 IE+	400 IE/200 IE+
14. Tag	i.v.	2000 IE	800 IE/400 IE
21. Tag	i.v.	"	"
28. Tag	i.v.	"	"
42. Tag		B L U T E N T N A H M E	

* Anteron^{R} ** Suigonan^{R}

\+ jeweils in 1 ml Solvens gelöst und mit 1 ml FAC emulgiert

Tab. 8: Übersicht über den Immunisierungsvorgang mit verschiedenen gonadotropen Hormonen bei Rind, Schwein, Schaf und Hund

Zeitpunkt d. Appl.	Art d. Appl.	P M S G*		PMSG/HCG**	H C G***		
		Rind	Schwein	Schwein	Schwein	Schaf	Hund
0 Tag	s.c.	3000 IE+	1000 IE+	400IE/200IE+	1500 IE+	1500 IE+	750 IE+
14. Tag	i.v.	6000 IE	2000 IE	800IE/400IE	3000 IE	3000 IE	1500 IE
21. Tag	i.v.	"	"	"	"	"	"
28. Tag	i.v.	"	"	"	"	"	"
42. Tag		B L U T E N T N A H M E					

* Intergonan^{R} ** Suigonan^{R} *** Ekluton^{R}

\+ jeweils in 5 ml Solvens gelöst und mit 5 ml FAC emulgiert

Die bereits erwähnten positiven Kontrollseren der Kaninchen, die aus früheren Versuchen zur Verfügung standen, wurden wie folgt gewonnen (FUNG, 1979): 500 IE HCG (Primogonyl^{R}) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit der gleichen Menge FAC emulgiert und den Tieren an zwei Stellen am Rücken subkutan injiziert. Diese Behandlung wurde dreimal im Abstand von jeweils zwei Wochen wiederholt. Am 56. Tag nach der letzten Injektion bekamen die Tiere 2000 IE HCG, nach weiteren 28 Tagen 2500 IE HCG intravenös verabreicht. Drei Tage später wurden die Kaninchen durch Genickschlag betäubt und mittels Herzpunktion entblutet.

Behandlung der Seren

Die zu prüfenden Seren, einschließlich der Kontrollseren, wurden vor der Durchführung des Tests bei 56^{o}C im Wasserbad 30 Minuten lang inaktiviert. Anschließend wurden zu je 1 ml Serum 0,1 ml gewaschene Hammelerythrozyten pipettiert und 30 Minuten bei 37^{o}C im Brutschrank bebrütet, um unspezifische Antikörper abzubinden, und dann aus dem Gemisch 10 Minuten bei 2000 g wieder abzentrifugiert.

Antigene

Als Antigene wurden PMSG- und HCG-Präparate benutzt, die von der Firma Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt worden waren (Kapitel 3.1.1).

Hormonkoppelung an Erythrozyten

Um die Antikörper nachzuweisen, wurden Hammelerythrozyten verwendet. Das Blut wurde in Alseverlösung aufgenommen und dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, d.h. in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, bei 2000 g 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und der Bodensatz erneut in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde mit Dulbecco's phosphate buffered salt solution (PBS) eine 10 %-ige Erythrozytensuspension hergestellt und mit dem doppelten Volumen des in PBS gelösten Hormons (PMSG: 1290 IE/ml; HCG: 3010 IE/ml) und dem gleichen Anteil 1 %-igen Glutaraldehyd zur Stabilisation gemischt und 120 Minuten bei 37°C im Brutschrank bebrütet. In 30-minütigen Abständen wurde das Gemisch erneut aufgeschüttelt. Nach dreimaligen Waschen der Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung wurden sie mit PBS auf eine Konzentration von 0,3 % eingestellt.

Durchführung des Tests

Von den zu testenden Seren wurde zunächst in Agglutinationsröhrchen eine Verdünnungsreihe in 2-er Potenzen mit 0,3 ml Serum angelegt. Zu jeder Verdünnungsreihe wurden 0,3 ml sensibilisierte Hammelerythrozyten hinzupipettiert.

Als Kontrollseren wurden Kaninchenimmunseren der entsprechenden Hormongruppe, Immunseren der zu untersuchenden Spezies

des entsprechenden Hormons, beides als positive Serumkontrollen, und jeweils ein Normalserum der einzelnen Tierarten, als negative Serumkontrolle, parallel zu den anderen Seren getestet. Weiter wurden alle Seren mit nicht sensibilisierten Hammelerythrozyten als Serumkontrollen, und der verwendete PBS-Puffer mit sensibilisierten und nicht sensibilisierten Hammelerythrozyten als PBS-Kontrollen auf unspezifische Reaktionen geprüft. Nach zweistündigem Bebrüten bei 37°C im Brutschrank wurden die Gemische erneut aufgeschüttelt und bei Zimmertemperatur für 18 Stunden stehen gelassen; dann erfolgte das Ablesen der Reaktion. Da die so erhaltenen Einzelwerte keine Normalverteilung aufwiesen, wurden die geometrischen Mittelwerte in Anlehnung an CAVALLI-SFORZA (1964) berechnet.

3.1.3.2 Radioimmunoassay mit HCG

Allgemeine Grundlagen

Dieser Test wurde unter der Leitung von Herrn Dr. K. Mann, Klinikum Großhadern der Universität München, nach der Doppelantikörpermethode durchgeführt. Die Markierung von HCG erfolgte mit der Chloramin-T-Methode nach GREENWOOD und HUNTER (1962). Hierbei oxidiert Chloramin-T Jod zu Jodid, das wiederum mit den zur Verfügung stehenden Tyrosinresten des Hormons in Verbindung tritt.

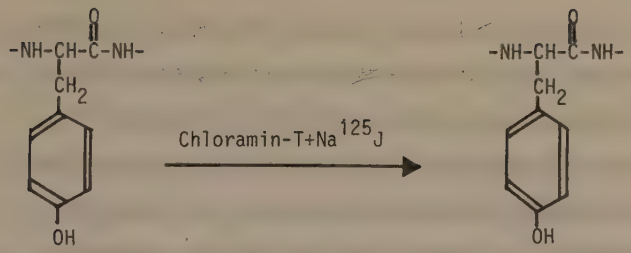


Abb. 1: Schema der Markierungsreaktion mit ^{125}Jod und Chloramin-T

Durch die Zugabe von Natriumdisulfidlösung sowie durch weitere Verdünnungen wird die Reaktion gestoppt. Mit den Methoden der Gelchromatographie, die in der Arbeit von GÖRING (1980) näher beschrieben sind, wird das markierte Antigen vom Jodsalz abgetrennt und bei - 40°C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Herstellung der Antiseren gegen HCG sowie der Testseren wurde bereits in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3.1 erwähnt.

Die präzipitierenden Antiseren, als zweiter Antikörper, gegen Pferde-, Schweine-, Schaf- und Hunde-γ-Immunglobuline wurden von der Firma Miles Biochemicals (Frankfurt-Main) bezogen.

Vorversuche

In diesen Versuchen wurde die geeignete Konzentration des zweiten Antikörpers bestimmt, bei der die beste Bindung zwischen dem zweiten Antikörper und den Antikörpern im Testserum stattfand. Hierzu wurden Seren der verschiedenen Spezies ausgewählt, die nach dem Ergebnis des PHA-Tests eine positive Bin-

dung im RIA erwarten ließen, d.h. die Immunseren. Von jedem dieser Seren wurde ein vierfacher Ansatz angelegt, und der zweite Antikörper unverdünnt und in den Verdünnungen 1:5, 1:10 und 1:15 mit Puffer A* dazugegeben. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte, daß der zweite Antikörper von Pferd und Hund unverdünnt, von Schwein und Schaf in einer Verdünnung von 1:5 einzusetzen ist, um eine maximale Bindung zu erhalten.

Durchführung des Tests

Parallel zu den zu testenden Seren wurden für jede Spezies folgende Kontrollen angelegt: In vier Kunststoffröhrchen wurde die Totalaktivität von 100 µl HCG-Tracer gemessen, der zuvor 1:300 mit einem Normalserum der entsprechenden Tierart verdünnt worden war. Als zweite Kontrolle wurde die unspezifische Bindung in jeweils drei Röhrchen gemessen, indem 300 µl Puffer A mit 100 µl Tracer gemischt wurden.

Für die im Doppelansatz getesteten Seren wurden 200 µl Puffer A in jedes Röhrchen vorgelegt. Dazu kamen 100 µl des jeweiligen Serums, das zuvor in 2-er Potenzen wie im PHA-Test mit Puffer A verdünnt worden war. Nachdem ebenfalls 100 µl des verdünnten Tracers hinzupipettiert worden waren, wurde das

*Puffer A: 0,01 mol/l KH_2PO_4, Na_2HPO_4, 0,1 mol/l NaCl,
10 g/l Rinderserumalbumin, 0,01 mol/l EDTA
200 mg/l Merthiolat, pH 7,5

Gemisch aufgeschüttelt und zusammen mit den Kontrollen 24 Stunden bei 22°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl des zweiten Antikörpers in entsprechender Konzentration, ausgenommen die positive Kontrolle des Tracers, wurde erneut aufgeschüttelt und die Proben bei 4°C für vier Stunden inkubiert. Nach 30-minütigem Zentrifugieren aller Proben, ausgenommen die positive Tracerkontrolle, bei 2000 g, wurde der Oberstand dekantiert, die Röhrchen an den Wänden mit Filterpapier trockengewischt und abschließend zur Bestimmung der Radioaktivität des Niederschlags in den γ-Strahlen-Counter eingegeben. Jede Probe wurde einmal zwei Minuten gemessen.

3.1.3.3 Aktiver kutaner Anaphylaxietest beim Rind mit PMSG

Diese Möglichkeit des Nachweises von Antikörpern wurde nur an Rindern mit PMSG durchgeführt. Folgende Untersuchungen wurden an sechs Kühen vorgenommen, deren Gruppeneinteilung aufgrund verschiedener Vorbehandlungen vorgenommen wurde:

Gruppe A: Drei Kühe (1-3), die im Abstand von 14 Tagen je 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) intramuskulär appliziert bekamen

Gruppe B: Eine Kuh (4) wurde nach dem üblichen Schema mit PMSG und FAC immunisiert (Kapitel 3.1.3.1)

Gruppe C: Zwei Kühe (5, 6) als Kontrollen

Der Test der kutanen Anaphylaxie wurde 14 Tage nach der letzten Injektion durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere im Halsbereich, der sich durch lockeres Bindegewebe am besten eignet, auf einer Fläche von ca. 40 x 40 cm geschoren und mit

Alkohol gereinigt. An fünf gleichmäßig (ca. 15 cm) voneinander entfernten Stellen wurde vor Versuchsbeginn die Hautfaltendicke mit einem Kutimeter gemessen und gekennzeichnet. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze und den speziell dazugehörenden Injektionsnadeln, um subkutane Injektionen zu vermeiden, wurden, ähnlich der Tuberkulinisierung, lokal 0,1 ml des gelösten Hormons bzw. 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung als Kontrolle intradermal appliziert. Die verschiedenen Gonadotropinkonzentrationen betrugen:

1. Injektionsstelle: 200 IE PMSG (Intergonan^{R}) in 0,1 ml phys. NaCl-Lösung
2. " " : 150 IE PMSG in 0,1 ml phys. NaCl-Lösung
3. " " : 100 IE " " " " " "
4. " " : 50 IE " " " " " "
5. " " : Kontrollinjektion von 0,1 ml phys. NaCl-Lösung

Die Hautdickenveränderungen wurden nach 1, 2, 6, 24 und 48 Stunden gemessen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Tierversuche

4.1.1 Passiver Hämagglutinationstest

4.1.1.1 Untersuchungen am Rind mit PMSG

Die Blutproben der Tiere aus Gruppe I (1 x 3000 IE PMSG i.m.) , die vor der ersten Injektion genommen wurden, wiesen keinen positiven Ausgangstiter auf. Im weiteren Verlauf der Probenentnahme wurde insgesamt nur ein Maximaltiter von 1:2, allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten,erreicht. Bei einem Tier ließ er sich 12 Tage post injectionem nachweisen und blieb bis zur letzten Probe unverändert, während er bei einem anderen Tier nach 24 Tagen auftrat, um in den folgenden Proben wieder zu sinken. Von zwei Tieren wurde dieser Titer nach 36 Tagen erreicht, während sich von einem Tier über den gesamten Untersuchungszeitraum kein positiver Titer nachweisen ließ (Tabelle 9).

Der Titer der mit PMSG und FAC immunisierten Kuh lag vergleichsweise dazu bei 1:128, der des immunisierten Kaninchens bei 1:256.

Der Ausgangstiter von den Tieren der Gruppe II (2 x 3000 IE PMSG i.m. im Abstand von 35 Tagen) lag bei einem Tier bei 1:8, bei den übrigen Versuchtieren darunter, während der Maximaltiter von 1:32 von einem Tier 24 Tage nach der ersten Injektion nachgewiesen wurde (Tabelle 10). Bei drei Tieren wurde der höch-

ste Titer von 1:16 nach 12 bzw. 24 Tagen gefunden. Bei einem Tier stellte sich 1:8 als Maximalwert nach 36 Tagen ein. Die Titer der Blutproben, die denjenigen des Maximaltiters folgten, zeigten bei allen Tieren einen Abfall um ein bis zwei Stufen, um dann, 12 Tage nach der Boosterinjektion bei drei Tieren um den gleichen Wert wieder anzusteigen, bzw. bei den zwei restlichen Tieren bis zur letzten Verfolgsprobe den Titer von 1:2 beizubehalten (Abbildung 2).

Die geometrischen Mittelwerte der Antikörpertiter der fünf Tiere je Gruppe von jeder Blutprobe sind in Tabelle 11 festgehalten.

Tab. 9: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen PMSG nach 1-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0) von 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) bei 5 Rindern. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörper-titer	Tage nach der PMSG-Injektion			
	0	12	24	36
0	5	4	3	2
1:2	0	1	2	3
1:4	0	0	0	0

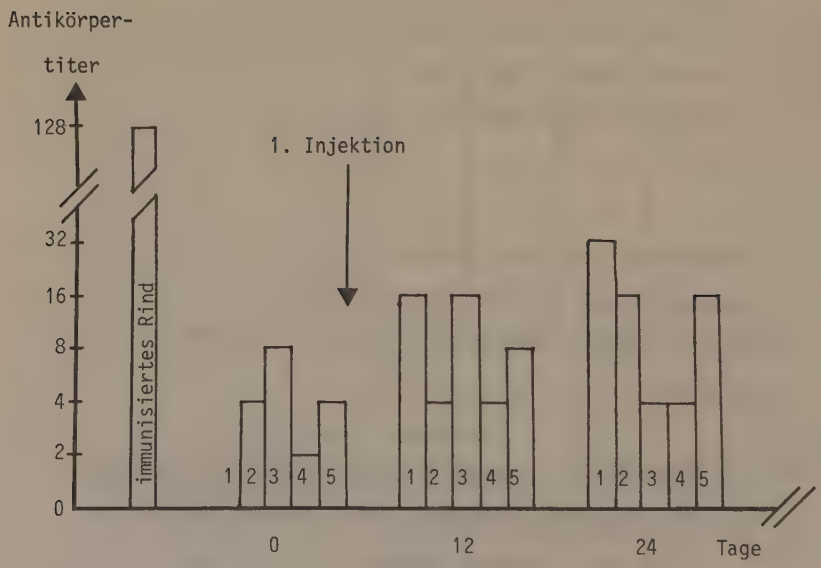
Tab. 10: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen PMSG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 35) von 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) bei 5 Rindern. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

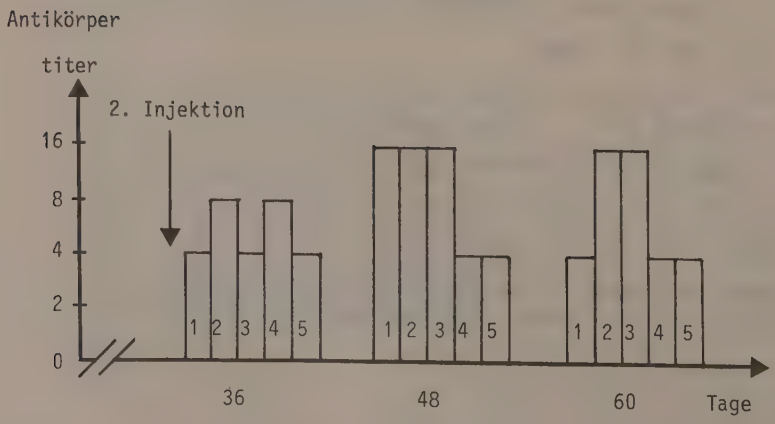
Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion					
	0	12	24	36	48	60
0	1	0	0	0	0	0
1:2	1	0	0	0	0	0
1:4	2	2	2	3	2	3
1:8	1	1	0	2	0	0
1:16	0	2	2	0	3	2
1:32	0	0	1	0	0	0

Tab. 11: Geometrische Mittelwerte der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest nach 1-maliger (Gruppe I am Tag 0) bzw. 2-maliger (Gruppe II am Tag 0 und 35) intramuskulärer Applikation von 3000 IE PMSG (Intergonan an 5 Rinder

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion					
	0	12	24	36	48	60
Gruppe I	0	1:1,2	1:1,3	1:1,5	-	-
Gruppe II	1:3,0	1:1,8	1:10,5	1:5,3	1:9,2	1:7,0

Abb. 2: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 35) von 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) an 5 Rindern (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 3000 IE PMSG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 6000 IE PMSG i.v.)





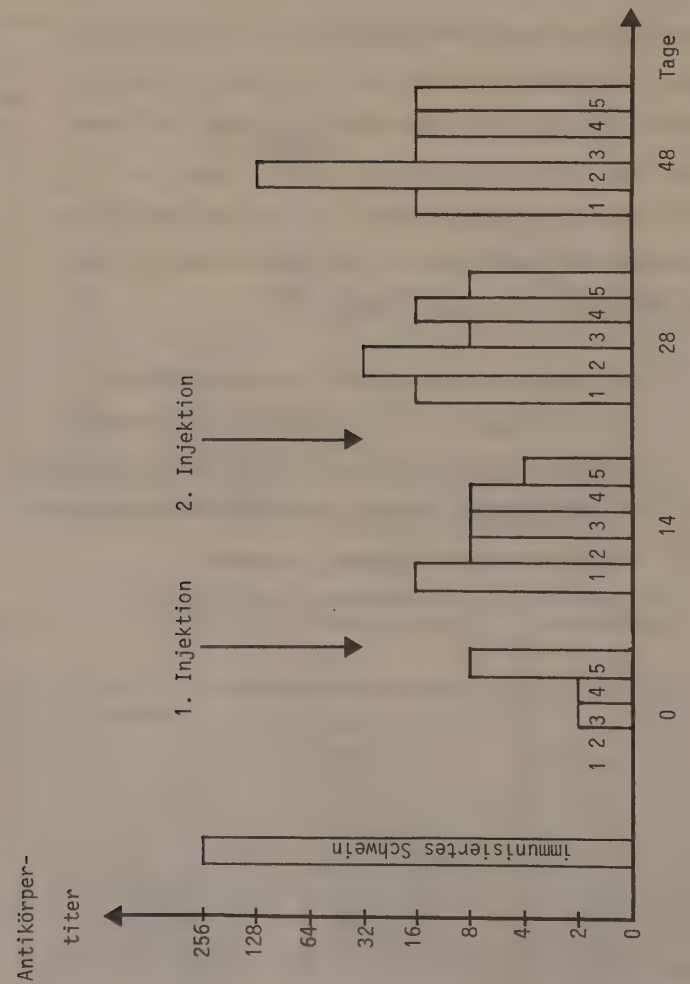
4.1.1.2 Untersuchungen am Schwein mit PMSG

Die Ausgangstiter lagen maximal bei 1:8. Nach der PMSG-Applikation betrug der höchste Titer bei vier Tieren 1:16 und bei einem 1:128. Ein Abfall konnte innerhalb des gesamten Versuchszeitraums bei keinem Schwein festgestellt werden. Ein Tier wies nach 14 Tagen, d.h. vor der zweiten PMSG-Applikation, bereits den höchsten Antikörpertiter auf, der unverändert beibehalten wurde. Die übrigen vier Versuchstiere erreichten den Maximaltiter nach vier bzw. sechs Wochen, also zwei bzw. vier Wochen nach der Boosterung, wobei die Titer zwischen den 14-tägigen Blutprobenentnahmen jeweils um ein bis zwei Stufen angestiegen waren. Die positive Kontrolle des mit PMSG und FAC immunisierten Tieres ergab einen Titer von 1:256 (Tabellen 12, 16 und Abbildung 3).

Tab. 12: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen PMSG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 1000 IE PMSG (Intergonan^{R}) bei 5 Schweinen. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion			
	0	14	28	42
0	2	0	0	0
1:2	2	0	0	0
1:4	0	1	0	0
1:8	1	3	2	0
1:16	0	1	2	4
1:32	0	0	1	0
1:128	0	0	0	1

Abb. 3: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 1000 IE PMSG (Intergonan^{R}) an 5 Schweine (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 1000 IE PMSG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 2000 IE PMSG i.v.)



4.1.1.3 Untersuchungen am Schwein mit PMSG/HCG

Da sich dieses Präparat aus 400 IE PMSG und 200 IE HCG zusammensetzt, wurden die Seren dieser Tiere auf Antikörper gegen PMSG und HCG überprüft. Zunächst soll auf die Ergebnisse mit PMSG eingegangen werden.

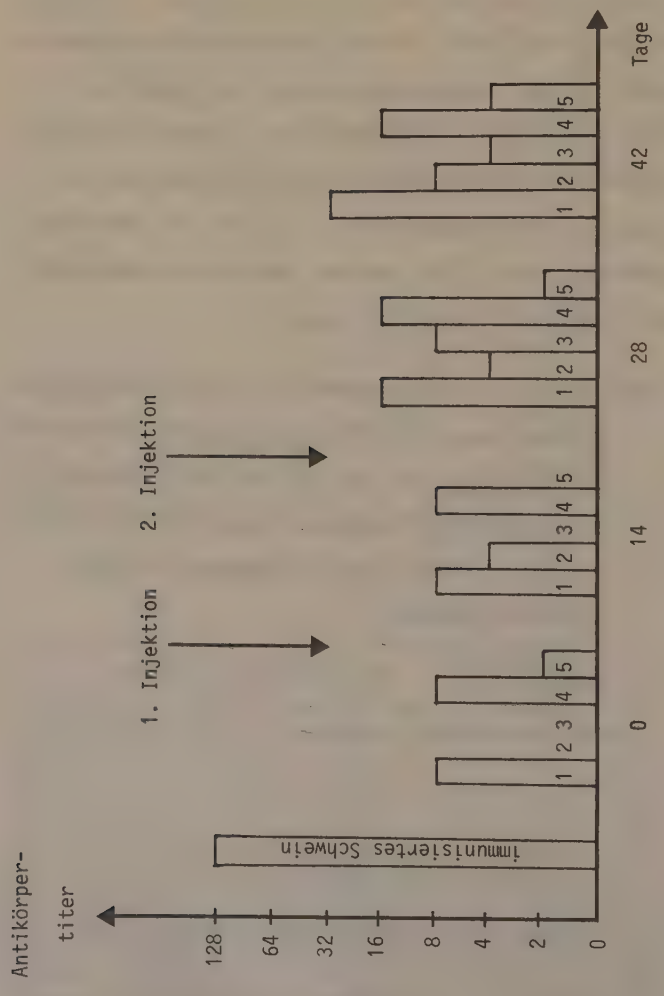
In dieser Gruppe war bei zwei Tieren kein positiver Ausgangstiter festzustellen, ein Tier hatte den Wert von 1:2 und zwei Schweine den Titer 1:8. Auch hier wurden die höchsten Titerstufen vier bis sechs Wochen nach der Erstinjektion, d.h. zwei bis vier Wochen nach der Boosterung, erreicht und lag bei einem Tier drei Stufen und bei je zwei Schweinen zwei bzw. eine Stufe über dem Ausgangswert. Der Titer des immunisierten Schweines betrug 1:128, der des immunisierten Kaninchens 1:1024 (Tabellen 13, 16 und Abbildung 4).

Tab. 13: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen PMSG/HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R}) bei 5 Schweinen. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt.

Gegen PMSG getestet

Antikörper-titer	Tage nach der 1. Injektion			
	0	14	28	42
0	2	2	0	0
1:2	1	0	1	0
1:4	0	1	1	2
1:8	2	2	1	1
1:16	0	0	2	1
1:32	0	0	0	1

Abb. 4: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R}) an 5 Schweine (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 400 IE PMSG/200 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 800 IE PMSG/400 IE HCG i.v.). Gegen PMSG getestet

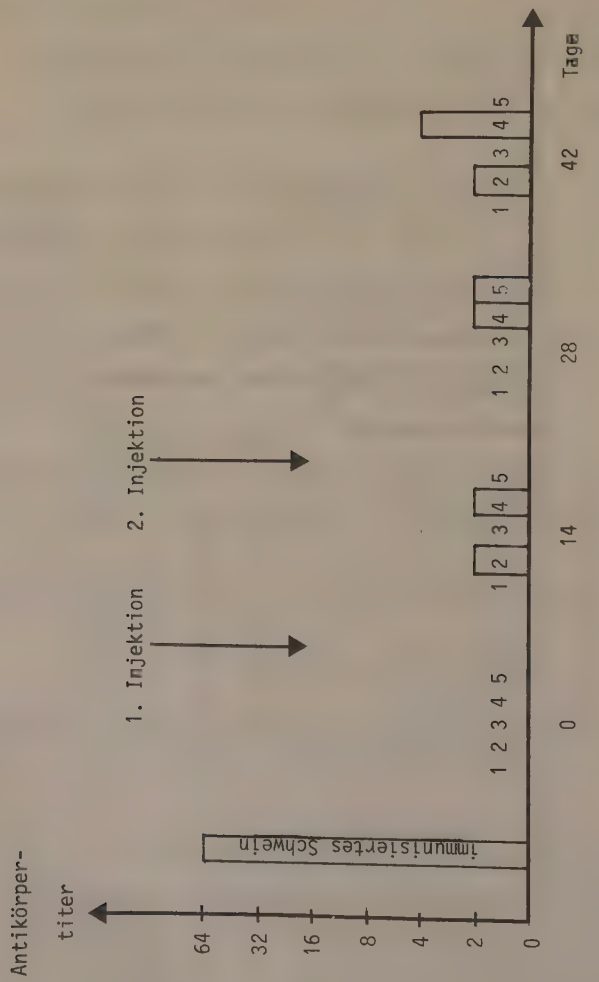


Gegen HCG ließ sich bei zwei Tieren, selbst nach der 14 Tage später vorgenommenen zweiten Injektion, kein positiver Titer über den gesamten Versuchszeitraum feststellen. Drei Schweine zeigten in der zweiten bis sechsten Woche einen Titer von 1:2. Den maximalen Antikörpertiter 1:4 erreichte ein Schwein in der sechsten Woche nach der ersten Hormonapplikation, bzw. vier Wochen nach der zweiten. Das positive Kontrollserum des mit dem Hormon und FAC immunisierten Schweines wies einen Titer von 1:64 auf, dasjenige des Kaninchens von 1:512 (Tabellen 14, 16 und Abbildung 5).

Tab. 14: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen PMSG/HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R}) bei 5 Schweinen. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt. Gegen HCG getestet

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion			
	0	14	28	42
0	5	3	3	3
1:2	0	2	2	1
1:4	0	0	0	1

Abb. 5: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R}) an 5 Schweine (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 400 IE PMSG/200 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 800 IE PMSG/400 IE HCG i.v.). Gegen HCG getestet



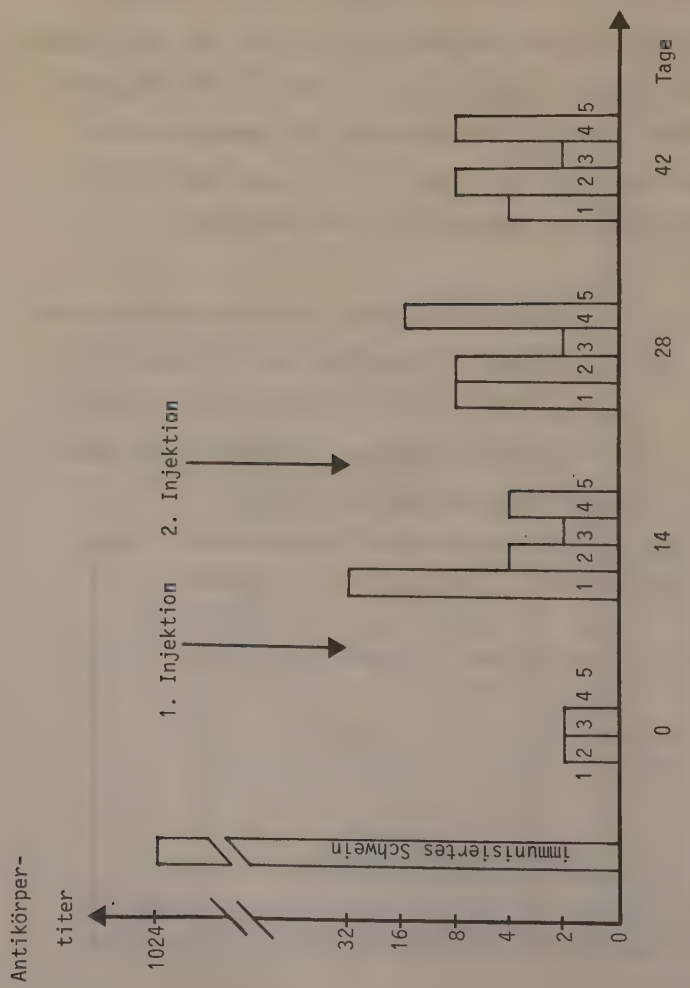
4.1.1.4 Untersuchungen am Schwein mit HCG

In dieser Gruppe ließ sich bei einem Schwein in keiner Serumprobe ein positiver Titer nachweisen; die Ausgangswerte der übrigen Tiere lagen maximal bei 1:2. Dieser Titer blieb bei einem Schwein über den ganzen Untersuchungszeitraum unverändert. Bereits 14 Tage post injectionem erreichte ein Tier einen Maximaltiter von 1:32, bei den restlichen Tieren lag der höchste Wert vier Wochen nach der ersten, bzw. zwei Wochen nach der zweiten Injektion, bei 1:16 und 1:8. Die entsprechenden Kontrollseren der mit Hormon und FAC behandelten Tiere wiesen einen Titer von 1:1024 für das Schwein und 1:512 für das Kaninchen auf (Tabellen 15, 16 und Abbildung 6).

Tab. 15: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 500 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Schweinen. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion			
	0	14	28	42
0	3	1	1	1
1:2	2	1	1	1
1:4	0	2	0	1
1:8	0	0	2	2
1:16	0	0	1	0
1:32	0	1	0	0

Abb. 6: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 500 IE HCG (Ekluton^{R}) an 5 Schweine (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 1500 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 3000 IE HCG i.v.)



Tab. 16: Geometrische Mittelwerte der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von PMSG (Gruppe I), PMSG/HCG (Gruppe II) und HCG (Gruppe III) an jeweils 5 Schweine

Behandlung	Tage nach der 1. Injektion			
	0	14	28	42
Gruppe I	1:2,0	1:8,0	1:13,9	1:24,3
Gruppe II*	1:2,6	1:3,0	1:7,0	1:9,2
Gruppe II**	0	1:1,3	1:1,3	1:1,5
Gruppe III	1:1,3	1:4,0	1:4,6	1:4,0

Gruppe I : 2 x 1000 IE PMSG (Intergonan^{R})

Gruppe II : 2 x 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R})

* im PHA-Test gegen PMSG getestet

** im PHA-Test gegen HCG getestet

Gruppe III: 2 x 500 IE HCG (Ekluton^{R})

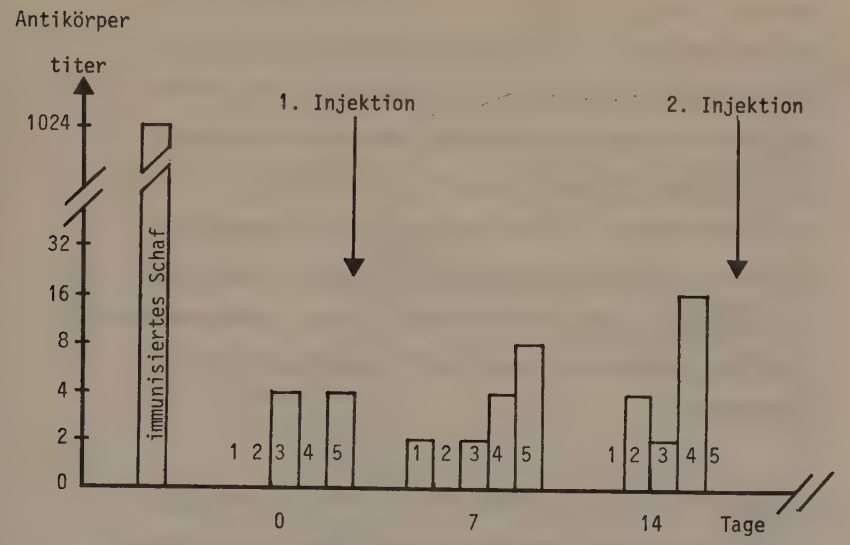
4.1.1.5 Untersuchungen am Schaf mit HCG

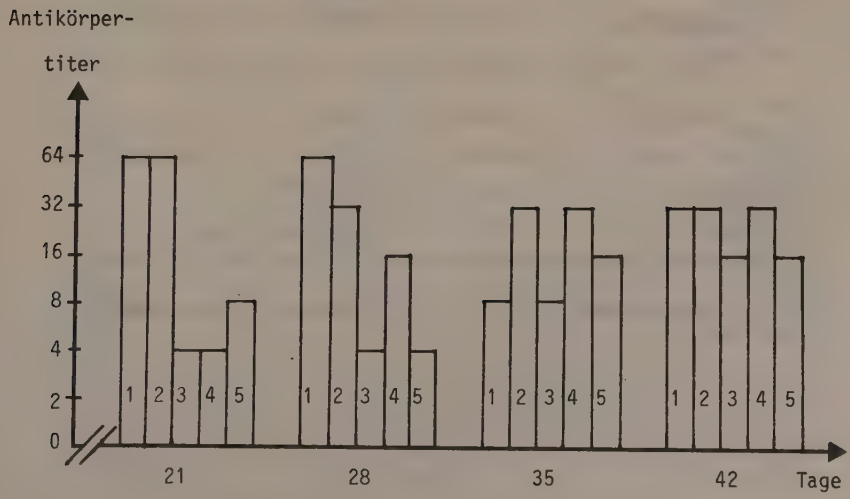
Der Reaktionsverlauf der Antikörperbildung gegen HCG entsprach dem der anderen Tierarten. Die Ausgangswerte lagen zwischen negativ und maximal 1:4. Zwei Tiere erreichten den maximalen Antikörpertiter von 1:64 drei Wochen nach der ersten, entsprechend eine Woche nach der zweiten Injektion. Die Titer fielen dann im weiteren Verlauf wieder ab. Die restlichen Schafe wiesen einen Titeranstieg mit mehr oder weniger starken Schwankungen bis zur letzten Probenentnahme auf, mit einem Maximalwert von 1:32 bei einem und von 1:16 bei zwei Tieren. Vergleichsweise dazu lag der Titer des mit HCG und FAC immunisierten Tieres bei 1:1024 (Tabellen 17, 20 und Abbildung 7).

Tab. 17: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 1500 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Schafen. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion						
	0	7	14	21	28	35	42
0	3	1	2	0	0	0	0
1:2	0	2	1	0	0	0	0
1:4	2	1	1	2	2	0	0
1:8	0	1	0	1	0	2	0
1:16	0	0	1	0	1	1	2
1:32	0	0	0	0	1	2	3
1:64	0	0	0	2	1	0	0

Abb. 7: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 1500 IE HCG (Ekluton^{R}) an 5 Schafe (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 1500 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 3000 IE HCG i.v.)





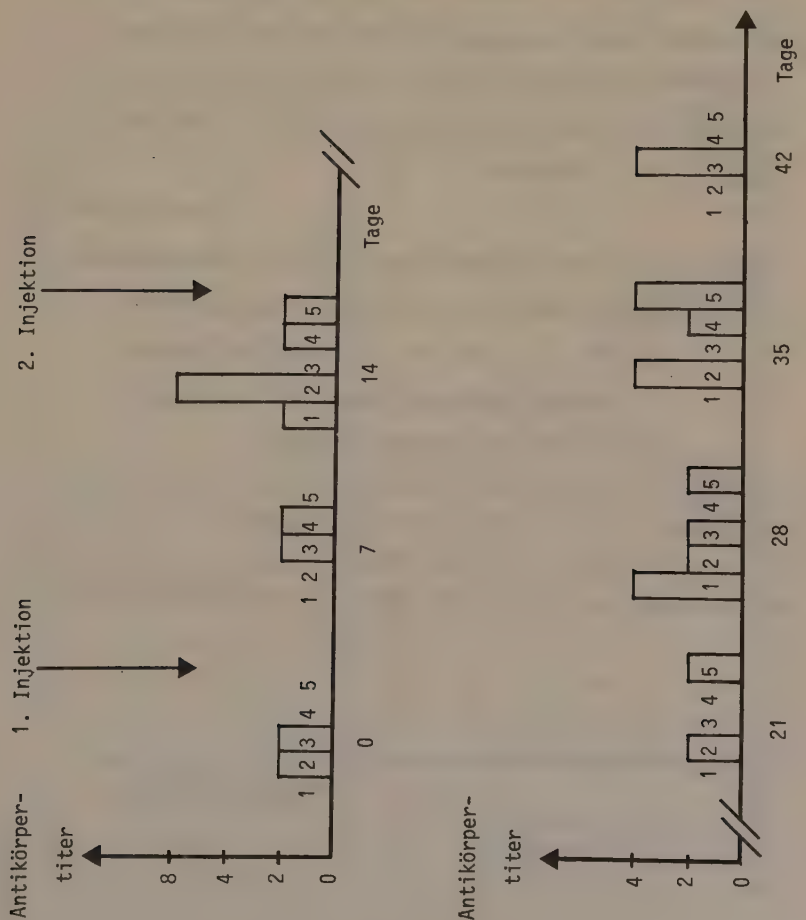
4.1.1.6 Untersuchungen am Pferd mit HCG

In den Blutproben, die vor der ersten Injektion genommen wurden, ließ sich bei zwei der fünf Tiere ein Titer von 1:2 nachweisen. Eine Reaktion auf die erste Hormonapplikation war bei allen Pferden nach ein bzw. zwei Wochen zu erkennen. Den höchsten Titer von 1:8 zeigte ein Tier, drei Tiere von 1:4 und ein Tier von 1:2. Bei einem Versuchstier blieb der Titer auf der erreichten Stufe über eine Woche, bei einem anderen über zwei Wochen konstant erhalten, während der Antikörpertiter bei drei Pferden in den weiteren Blutproben um ein bis zwei Stufen abfiel. Im Laufe von zwei bis drei Wochen nach der zweiten Hormoninjektion konnte wiederum ein Titeranstieg um ein bis zwei Stufen beobachtet werden, der in der darauffolgenden Verlaufsprobe erneut abfiel (Tabellen 18, 20 und Abbildung 8).

Tab. 18: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 3000 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Pferden. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion						
	0	7	14	21	28	35	42
0	3	3	1	3	1	2	4
1:2	2	2	3	2	3	1	0
1:4	0	0	0	0	1	2	1
1:8	0	0	1	0	0	0	0

Abb. 8: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 3000 IE HCG (Ekluton^{R}) an 5 Pferde (1-5)



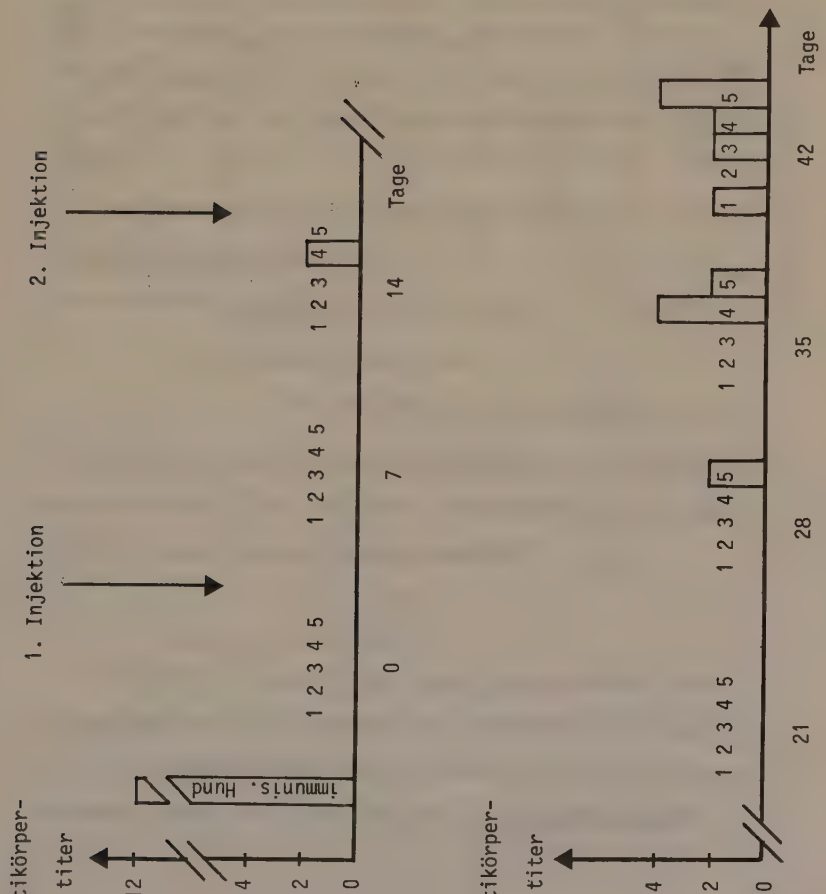
4.1.1.7 Untersuchungen am Hund mit HCG

Bei dieser Spezies konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den Pferden, d.h. nur geringe Titerstufen, festgestellt werden. Die Ausgangswerte waren negativ. Nach den Injektionen lagen sie bei allen Hunden zwischen 1:2 und 1:4 und blieben fünf bis sechs Wochen nach der ersten, bzw. drei bis vier Wochen nach der zweiten Injektion, nachweisbar. Ein Hund wies allerdings in keiner Blutprobe einen Titer auf. Das mit HCG und FAC immunisierte Tier zeigte einen positiven Titer von 1:512 (Tabellen 19, 20 und Abbildung 9).

Tab. 19: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest gegen HCG nach 2-maliger intramuskulärer Injektion (Tag 0 und 14) von 750 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Hunden. Angabe der Tierzahl mit dem entsprechenden Titer zum gegebenen Zeitpunkt

Antikörpertiter	Tage nach der 1. Injektion						
	0	7	14	21	28	35	42
0	5	5	4	5	4	3	1
1:2	0	0	1	0	1	1	3
1:4	0	0	0	0	0	1	1

Abb. 9: Individueller Verlauf der Antikörpertiter nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 750 IE HCG (Ekluton^{R}) an 5 Hunde (1-5) im Vergleich zu einem immunisierten Tier (Tag 0: 750 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 1500 IE HCG i.v.)



Tab.20: Geometrische Mittelwerte der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest nach 2-maliger intramuskulärer Applikation (Tag 0 und 14) von 1500 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Schafen, von 3000 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Pferden und von 750 IE HCG (Ekluton^{R}) bei 5 Hunden

Spezies	Tage nach der 1. Injektion						
	0	7	14	21	28	35	42
Schaf	1:1,7	1:2,6	1:2,6	1:13,9	1:13,9	1:16,0	1:24,3
Pferd	1:1,3	1:1,3	1:2,3	1:1,3	1:2,0	1:2,0	1:1,3
Hund	0	0	1:1,1	0	1:1,1	1:1,5	1:1,7

4.1.2 Radioimmunoassay mit HCG

Es sollte festgestellt werden, inwieweit diese Methode des Antikörpernachweises mit dem passiven Hämagglutinationstest vergleichbar ist. Aus technischen Gründen konnten aus jeder HCG-behandelteten Gruppe der verschiedenen Tierarten jeweils nur die Seren zweier Tiere für die Untersuchung herausgegriffen werden. Ferner wurden die Seren zweier Tiere der PMSG/HCG-behandelten Schweine und die Seren der immunisierten Tiere vor und nach der Behandlung in den Versuch mit einbezogen.

Die Auswertung des Radioimmunoassays erfolgte anhand folgender Werte (GÜRING, 1980):

T = Totalaktivität des Tracers

N = unspezifische Bindung

B = spezifische Bindung der untersuchten Probe

Aus diesen Meßwerten bzw. deren Mittelwerte, die als counts/min erhalten wurden, ließ sich die spezifische Bindung der Serumprobe in % nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{B - N}{T - N} \times 100$$

Grundsätzlich waren in den Ergebnissen von beiden Methoden gewisse Parallelen erkennbar. Im oberen Bereich der Werte war die Diskrepanz größer als im unteren. Eine direkte lineare Beziehung konnte nicht festgestellt werden (Tabellen 21-29).

Tab. 21: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest im Vergleich zu den Antiserumkonzentrationen im Radioimmunoassay nach 2-maliger intramuskulärer Verabreichung (Tag 0 und 14) von 400 IE PMSG/200 IE HCG (Suigonan^{R}) an 2 Schweine

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Injektion	1. Tier		2. Tier	
	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	0	0	0
14	1:2	0,2	0	0
28	0	0	0	0
42	1:2	0	0	0

Tab. 22: Vergleich des Antikörpertiters im passiven Hämagglutinationstest zu der Antiserumkonzentration im Radioimmunoassay vor (Tag 0) und nach (Tag 40) der Immunisierung eines Schweines mit PMSG/HCG (Suigonan^{R})- Tag 0: 400 IE PMSG/200 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 800 IE PMSG/400 IE HCG i.v.

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Inj.	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	0
40	1:64	59,0

Tab. 23: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest im Vergleich zu den Antiserumkonzentrationen im Radioimmunoassay nach 2-maliger intramuskulärer Verabreichung (Tag 0 und 14) von 500 IE HCG (Ekluton^{R}) an 2 Schweine

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Injektion	1. Tier		2. Tier	
	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	1:2	0	1:2	0,6
14	1:2	0	1:4	0
28	1:2	0	1:8	0
42	1:2	0	1:8	0

Tab. 24: Vergleich des Antikörpertiters im passiven Hämagglutinationstest zu der Antiserumkonzentration im Radioimmunoassay vor (Tag 0) und nach (Tag 40) der Immunisierung eines Schweines mit HCG (Ekluton^{R})- Tag 0: 1500 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 3000 IE HCG i.v.

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Inj.	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	0
40	1:1024	72,8

Tab. 25: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest im Vergleich zu den Antiserumkonzentrationen im Radioimmunoassay nach 2-maliger intramuskulärer Verabreichung (Tag 0 und 14) von 1500 IE HCG (Ekluton^{R}) an 2 Schafe

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Injektion	1. Tier		2. Tier	
	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	1:4	0,5	0	0,3
7	1:2	0,4	1:4	0,1
14	1:2	0,3	1:16	0,3
21	1:4	0,5	1:4	1,6
28	1:4	0,8	1:16	0,8
35	1:8	1,3	1:32	0,8
42	1:16	1,2	1:32	0,7

Tab. 26: Vergleich des Antikörpertiters im passiven Hämagglutinationstest zu der Antiserumkonzentration im Radioimmunoassay vor (Tag 0) und nach (Tag 40) der Immunisierung eines Schafes mit HCG (Ekluton^{R})- Tag 0: 1500 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 3000 IE HCG i.v.

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Inj.	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	0,1
40	1:1024	11,9

Tab. 27: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest im Vergleich zu den Antiserumkonzentrationen im Radioimmunoassay nach 2-maliger intramuskulärer Verabreichung (Tag 0 und 14) von 3000 IE HCG (Ekluton^{R}) an 2 Pferde

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Injektion	1. Tier		2. Tier	
	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	1:2	0,2	1:2	0
7	0	0	1:2	0
14	1:8	7,6	0	0
21	1:2	1,0	0	0
28	1:2	0,2	1:2	0,4
35	1:4	2,1	0	0
42	0	0	1:4	2,8

Tab. 28: Verlauf der Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest im Vergleich zu den Antiserumkonzentrationen im Radioimmunoassay nach 2-maliger intramuskulärer Verabreichung (Tag 0 und 14) von 750 IE HCG (Ekluton^{R}) an 2 Hunde

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Injektion	1. Tier		2. Tier	
	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	2,0	0	1,0
7	0	2,1	0	0,9
14	0	4,3	1:2	4,5
21	0	5,8	0	7,0
28	0	8,7	0	1,5
35	0	4,0	1:4	15,9
42	1:2	11,6	1:2	3,9

Tab. 29: Vergleich des Antikörpertiters im passiven Hämagglutinationstest zu der Antiserumkonzentration im Radioimmunoassay vor (Tag 0) und nach (Tag 40) der Immunisierung eines Hundes mit HCG (Ekluton^{R})- Tag 0: 750 IE HCG in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 1500 IE HCG i.v.

Blutprobenentnahme: Tag nach d. 1. Inj.	PHA-Test (Titer)	RIA (% Bindung)
0	0	0,3
40	1:256	56,7

4.1.3 Aktive kutane Anaphylaxie

Bei den zweimal mit 3000 IE PMSG intramuskulär vorbehandelten sowie den unbehandelten Kühen trat die maximale Hautdickenzunahme zwei Stunden nach der intradermalen reaktionsauslösenden Injektion ein, während das mit PMSG und FAC immunisierte Tier nach sechs Stunden maximal reagierte. Die applizierte Hormonmenge von 200, 150, 100 und 50 IE PMSG zeigte in Bezug auf die Stärke der Reaktion geringfügige Unterschiede. An der mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten Stelle zeigte sich die maximale Reaktion bereits nach einer Stunde. An den Stellen der höheren Hormondosen (200 und 150 IE) war eine deutlichere Reaktion als bei den kleinen Dosierungen zu erkennen. Die Hautreaktionen bei dem immunisierten Tier entsprach etwa der der zweimal vorbehandelten Kühe. Die Hautanschwellung bei den Kontrollkühen fiel deutlich geringer aus (Tabellen 30, 31; Abbildungen 10-12).

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich, daß der Umfang der Anschwellung weitgehend von der intradermal applizierten Hormondosis unabhängig war. Allgemeinreaktionen, wie z.B. Juckreiz, Unruhe, Ödeme oder Tränen- und Speichelfluß, wurden bei keinem der Versuchstiere beobachtet.

Tab. 30: Maximale Hautdickenzunahme (mm, $\bar{x}$) bei 6 PMSG-vorbehandelten * Kühen 2 Stunden (Gruppe A und C) bzw. 6 Stunden (Gruppe B) nach der intradermalen Injektion von 50, 100, 150 und 200 IE PMSG (Intergonan^R)

Reaktionsauslösende intradermale Injektion	Gruppe A n=3	Gruppe B n=1	Gruppe C n=2
200 IE PMSG	1,5	2,5	1,1
150 IE "	1,6	1,1	0,8
100 IE "	1,4	0,7	0,6
50 IE "	0,9	0,2	0,5
phys. NaCl-Lösung	0,1	0,1	0,1

* Gruppe A: 2 x 3000 IE PMSG (Intergonan^R) i.m. im Abstand von 14 Tagen

Gruppe B: immunisiertes Tier; Tag 0: 3000 IE PMSG (Intergonan^R) gelöst in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c..
Tag 14, 21 und 28: 6000 IE PMSG (Intergonan^R) i.v.

Gruppe C: unbehandelte Kontrolltiere

n = Anzahl der Tiere

Tab. 31: Maximale Hautdickenzunahme (mm) bei 6 PMSG-vorbehandelten* Kühen (1-6) 2 Stunden (Gruppe A und C) bzw. 6 Stunden (Gruppe B) nach der intradermalen Injektion von 50, 100, 150 und 200 IE PMSG (Intergonan^{R})

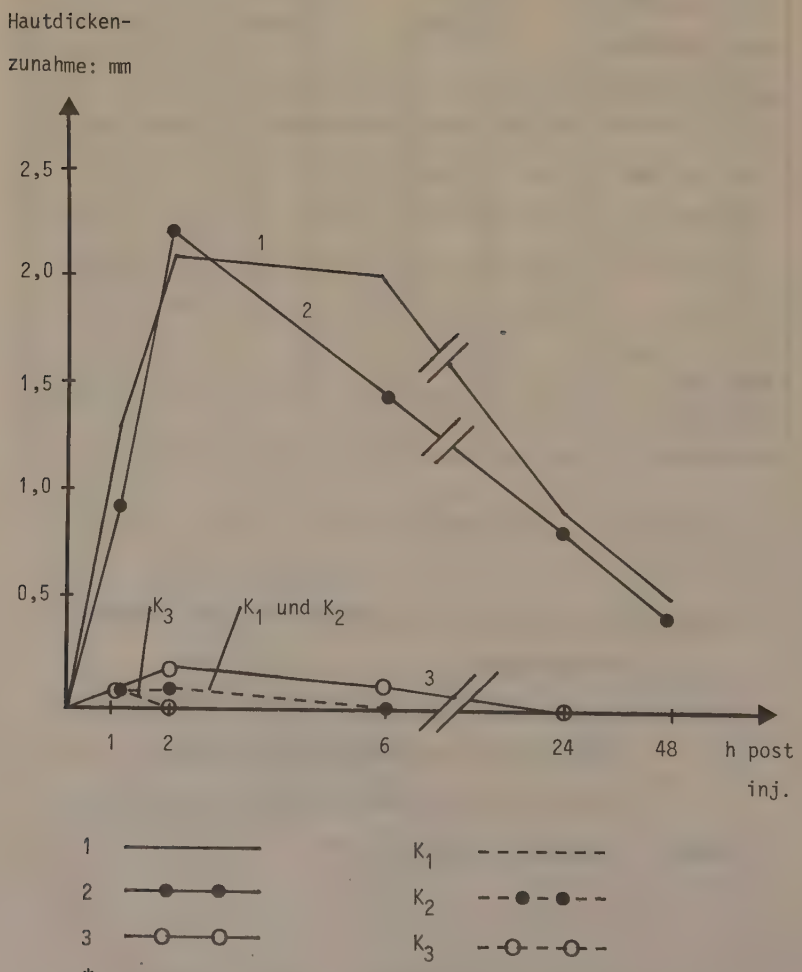
Reaktionsauslösende intradermale Injektion	Gruppe A			Gruppe B	Gruppe C	
	1	2	3	4	5	6
200 IE PMSG	2,1	2,2	0,2	2,5	0,8	0,5
150 IE "	1,7	2,3	0,6	1,1	0,7	0,9
100 IE "	1,5	2,1	0,5	0,7	0,8	0,4
50 IE "	1,1	1,5	0,2	0,2	0,6	0,4
phys. NaCl-Lösung	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

* Gruppe A: 2 x 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) i.m. im Abstand von 14 Tagen

Gruppe B: immunisiertes Tier; Tag 0: 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) gelöst in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c..
Tag 14, 21 und 28: 6000 IE PMSG (Intergonan^{R}) i.v.

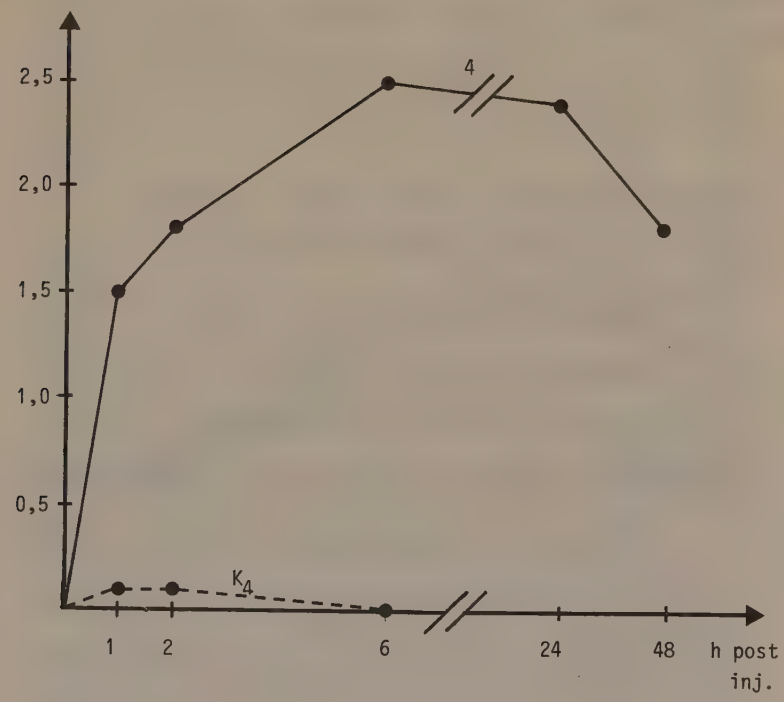
Gruppe C: unbehandelte Kontrolltiere

Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Hautdickenzunahme (mm) bei PMSG (Intergonan^{R}) vorbehandelten Kühen* der Gruppe A (1-3) nach der intradermalen Injektion von 200 IE PMSG (Intergonan^{R}) bzw. 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle (K_1-K_3)



* 2 x 3000 IE PMSG i.m. im Abstand von 14 Tagen

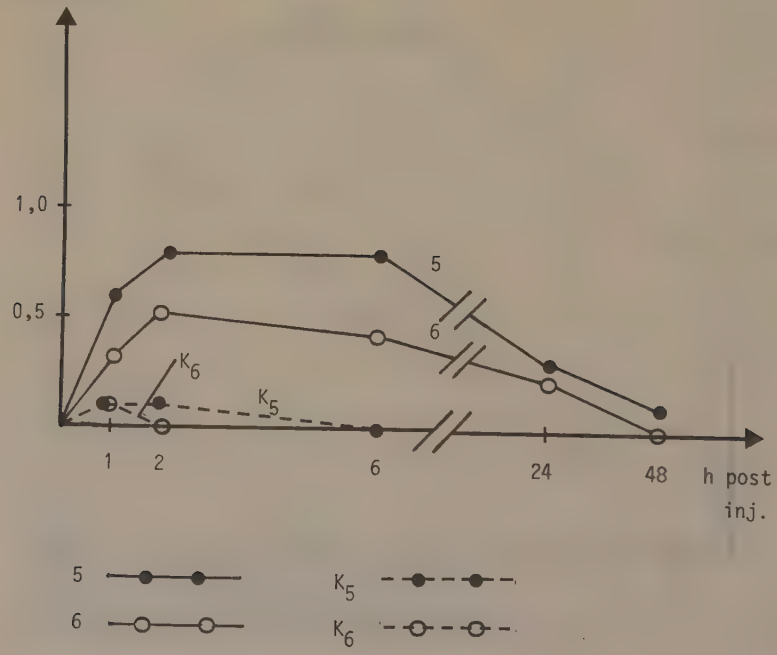
Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Hautdickenzunahme (mm) bei einer immunisierten Kuh* der Gruppe B (4) nach der intradermalen Injektion von 200 IE PMSG (Intergonan^{R}) bzw. 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle (K_4)



* Immunisierung: Tag 0: 3000 IE PMSG (Intergonan^{R}) in 5 ml Solvens + 5 ml FAC s.c.; Tag 14, 21 und 28: 6000 IE PMSG (Intergonan^{R}) i.v.

4 ——●——●—— K_4 -●- -●- -

Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Hautdickenzunahme (mm) bei unbehandelten Kontrolltieren der Gruppe C (5 und 6) nach der intradermalen Injektion von 200 IE PMSG (Intergonan^{R}) bzw. 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung (K_5 und K_6)



5. DISKUSSION

Mit dem vermehrten Einsatz der extrahypophysären Gonadotropine HCG und PMSG in Therapie und bei biotechnischen Maßnahmen sind auch mögliche Komplikationen und Schäden aufgrund immunologischer Folgereaktionen verstärkt zu beachten. Da beide Hormone, ausgenommen PMSG für das Pferd, für die Haussäugetiere körperfremde Glykoproteine, noch dazu mit hohem Molekulargewicht und langer Halbwertzeit, darstellen, kann eine Immunreaktion nach parenteraler Applikation nicht ausgeschlossen werden.

Es besteht kein Zweifel darüber, daß beide Gonadotropine zusammen mit FAC als Adjuvans beispielsweise, im Stande sind, bei den verschiedenen Spezies eine spezifische Antikörperbildung zu induzieren. Es bleibt aber die Frage, ob auch unter therapeutischen Bedingungen eine klinisch relevante Antikörperbildung eintritt und wieweit tierartliche Unterschiede zu beachten sind.

In Versuchen an Rindern konnte bisher gezeigt werden, daß sowohl die HCG- als auch die PMSG-Dosis extrem hoch sein muß, um eine deutlich positive Antikörperproduktion hervorzurufen. Da beide Hormone in praxi nicht in derart hohen Dosen eingesetzt werden, wird die Möglichkeit der immunologischen Folgereaktionen durch eine Antikörperproduktion nach therapeutischer HCG und/oder PMSG-Verabreichung für gering gehalten (COLE et al., 1957; JAINUDEEN et al., 1966; SCHAMS et al., 1978; FUNG, 1979; LUBBADEH et al., 1980). Als andere Begründung für eine

geringe Bedeutung immunologischer Folgen kann angeführt werden, daß diese Hormone im allgemeinen in physiologischer Kochsalzlösung gelöst bei den Tieren i.d.R. einmalig subkutan oder intramuskulär verabreicht werden.

Auch in den eigenen Untersuchungen mit PMSG bei Rind und Schwein, PMSG/HCG beim Schwein und schließlich HCG bei Schwein, Schaf, Pferd und Hund konnte bestätigt werden, daß nach therapeutischen Dosen und nach zweimaliger intramuskulärer Applikation nur sehr geringe Antikörperbildung eintrat. In den Versuchen an Rindern und Schweinen mit PMSG, nur hier waren weibliche und männliche Tiere vertreten, konnte kein Unterschied in der Reaktion zwischen den weiblichen und männlichen Versuchstieren festgestellt werden.

Als weitere wichtige Parameter für eine Antikörperbildung werden Dosis und die Häufigkeit bzw. die Abstände zwischen den Injektionen angesehen (SELL, 1977). Am Beispiel des PMSG/HCG-Mischpräparates (400 IE PMSG/200 IE HCG) konnte gezeigt werden, daß hier die Reaktion der Tiere auf beide Hormone deutlich geringer ausfiel als bei den Schweinen, die 1000 IE PMSG bzw. 500 IE HCG injiziert bekamen. Eindeutige Erhöhungen im Titer nach der ersten und zweiten Injektion konnten nicht bei allen Tierarten beobachtet werden, was z.T. wohl auf die Grenzen des Nachweises mit dem PHA-Test, der Empfindlichkeit der Spezies oder im Intervall der Blutprobenentnahme begründet sein kann. Auffallend war jedoch, daß einige Tiere, unabhängig von der Art, bereits vor der ersten Injektion geringgradig positive Titer aufwiesen. Es muß an unspezifische Reaktionen ge-

dacht werden oder auch daran, daß das betreffende Tier schon vorher mit dem Hormon in Kontakt gekommen war. Für einige Tiere konnte dies jedoch mit Sicherheit ausgeschlossen werden, so daß deren positiver Titer als unspezifische Reaktion angesehen werden muss.

Die Schlußfolgerungen der verschiedenen in der Literatur vorliegenden Arbeiten sind unterschiedlich, weil Fragestellungen, Versuchsanordnungen und Nachweismethoden nicht identisch sind. Heute wird der aufwendige Bioassay durch schnellere, billigere und empfindlichere Immunoassays abgelöst (BRODY und CARLSTRÖM, 1965; FRIESEN, 1973), wie ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) und RIA. Der große Vorteil dieser Methoden liegt u.a. darin, daß zwischen den Antikörpern unterschieden werden kann, die gegen das Hormon oder gegen die sog. "Begleitstoffe" gerichtet sind. Daß nicht nur die Antikörperbildung, sondern auch die Allergien z.T. auf diese Substanzen zurückzuführen sind, wurde in einigen Arbeiten bestätigt (AITKEN und SANFORD, 1969; MAYR und BIBRACK, 1970; FORCELLEDO und DE LA LASTRA, 1977; FUNG, 1979). Nach den Untersuchungen von MOLLER et al. (1980) an mit HCG und FAC immunisierten Kühen wurden die Antikörper mit Hilfe des GEDELISA (gel electrophoresis derived ELISA), einer Kombination aus Polyacrylamid-Gelelektrophorese und ELISA, nachgewiesen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Bestimmung von Antikörpern gegen jede Fraktion eines Antigengemisches. Wurde das Serum vor der ersten Injektion getestet, lag die Extinktion unter 0,1, nach zweimaliger HCG/FAC-Verabreichung

bei ca. 0,9. Da dieses Verfahren noch ohne klare Quantifizierung ist, kann die klinische Relevanz nicht diskutiert werden.

In diesen Untersuchungen konnten in den Ergebnissen im PHA-Test und im RIA gewisse Parallelen festgestellt werden. Die stichprobenweise durchgeführten Untersuchungen sollten grundsätzlich die Vergleichbarkeit dieser beiden Testverfahren bringen. Es hat sich gezeigt, daß der PHA-Test auch heute noch für bestimmte Fragestellungen seine Gültigkeit besitzt. Größere Abweichungen ergaben sich nur bei den Seren von Schafen, die im PHA-Test Titer bis zu 1:32 aufwiesen und deren Bindung im RIA jedoch z.T. unter 1 % lag. Ursächlich könnte die Verwendung von Hammelerythrozyten bei der Sensibilisierung im PHA-Test verantwortlich sein. Nachdem die Proben mit nicht sensibilisierten Hammelerythrozyten negativ waren, können Blutgruppenunverträglichkeiten ausgeschlossen werden. Demnach wäre es denkbar, daß der Hammel aufgrund früherer Hormonbehandlungen Antikörper gegen HCG besaß, und diese mit dem Antigen zusätzlich reagierten und so das eigentliche Ergebnis des Testserums erhöhten. Außerdem ist zu erwähnen, daß in dem hier durchgeführten RIA der Doppelantikörpermethode nur die γ-Globuline als Antikörperfraktion berücksichtigt wurden, während im PHA-Test eine Differenzierung nicht möglich ist. Im allgemeinen wurden jedoch die Ergebnisse im PHA-Test mit dem RIA bestätigt.

In diesem Zusammenhang soll noch auf eventuelle Folgereaktionen bei einer Antikörperbildung eingegangen werden.

Nicht alle gegen biologisch aktive Moleküle gebildeten Antikörper sind neutralisierend. Der Wirkungsverlust nach wiederholter Hormonverabreichung an das selbe Tier kann auf eine direkte Inaktivierung durch die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes oder indirekte Inaktivierung zurückgeführt werden, bei der die Wechselwirkung der Antikörper mit dem Hormon z.B. zu einer schnelleren Katabolisierung desselben führt (SELL, 1977).

Die bisherigen Arbeiten über eine Neutralisierung der Hormonwirkung oder dem Ausbleiben eines klinischen Effektes nach wiederholter Gonadotropinverabreichung ergeben kein klares Bild. Ein eintretender Wirkungsverlust der Hormone wurde meist der Ausbildung von spezifischen Antikörpern zugeschrieben. In Untersuchungen beim Pferd über HCG-spezifische Antikörper war nach mehreren Injektionen kein Wirkungsverlust zu beobachten, obwohl sich bei einigen Tieren signifikante Antikörpertiter nach zwei bis fünf Applikationen entwickelten (ROSER et al., 1979). Von diesen Autoren wurden Kreuzreaktionen zwischen endogenem LH und den gebildeten Antikörpern gegen HCG in vitro ausgeschlossen. Die Kapazität der gebildeten Antikörper würde in vivo ausreichen, das 2-10-fache einer in therapeutischer Dosis applizierten HCG-Menge (2644 IE) zu binden. Als Erklärung für diese Beziehung wurde eine Antigen-Antikörper-Verbindung angenommen, bei der nur die antigenen Stellen des HCG-Moleküls mit einbezogen wurden, und die biologisch wichtigen Teile für die Reaktion mit den entsprechenden Rezeptoren des Ovars unbeeinflußt blieben. Ähnliche Verhältnisse könnten auch für die anderen Haustiere in Betracht kommen.

Als weitere Möglichkeit von Folgereaktionen kommt die Ausbildung einer Allergie in Betracht. Klinische Symptome einer Allgemeinreaktion wurden bisher nur in einem Fall beim kutanen Anaphylaxietest an einem mit HCG und FAC immunisierten Tier beschrieben (FUNG, 1979). Da ähnliche Symptome bei einem Kontrolltier auftraten, nahm FUNG (1979) eher eine Sensibilisierung des Tieres gegen die Begleitstoffe des Hormonpräparats an. Da diese Erscheinungen nur nach der intradermalen Applikation von HCG in hoher Dosierung zu beobachten waren, waren bei den eigenen Untersuchungen möglicherweise die intrakutan verabreichten PMSG-Mengen zu gering, um stärkere Reaktionen zu induzieren. Höhere Dosierungen konnten in dem Volumen von 0,1 ml, notwendig für die intradermale Injektion beim kutanen Anaphylaxietest, wegen der schlechten Löslichkeit des Hormons nicht überprüft werden. Schon die Höchstdosis von 200 IE PMSG, wie sie in diesen Versuchen eingesetzt wurden, führten bei einem Vehikelvolumen von 0,1 ml zu einer zähen Flüssigkeit.

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß Immunreaktionen im Sinne einer Allergie nach der wiederholten Applikation therapeutischer Hormondosen nicht ausgeschlossen werden können; sie wurden aber nur bei experimentellen Arbeiten beobachtet und sind unter Praxisbedingungen unwahrscheinlich, bzw. wenn überhaupt, dann als sehr seltene Zwischenfälle einzustufen.

6. . ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe des passiven Hämagglutinationstests wurde die Antikörperbildung nach PMSG-Gaben an Rinder und Schweine, PMSG/HCG-Applikation an Schweine und HCG-Verabreichung an Schweine, Schafe, Pferde und Hunde untersucht. Zusätzlich wurden stichprobenweise die Seren von jeweils zwei Tieren der HCG-behandelten Spezies im Radioimmunoassay überprüft.

Rind: Es konnten weder nach ein- noch nach zweimaliger intramuskulärer Applikation von 3000 IE PMSG hoher Antikörpertiter festgestellt werden. Der höchste Titer betrug bei einem Tier 1:32 nach zweimaliger Hormoninjektion.

Der aktive kutane Anaphylaxietest an unbehandelten und behandelten (2 x 3000 IE PMSG bzw. PMSG + FAC) Kühen führte bei fast allen Tieren nur zu einer geringen Hautdickenzunahme, die bei den vorbehandelten Tieren etwas ausgeprägter als bei den Kontrolltieren war. Eindeutige Beziehungen zwischen der Hautdickenzunahme und der unterschiedlichen Vorbehandlung, bzw. der intradermal applizierten Hormondosis, ließen sich nicht ableiten. Allgmeinreaktionen, als Ausdruck einer sofort reagierenden Allergie, wurden bei keinem Tier festgestellt.

Schwein: Die zweimalige intramuskuläre Injektion von 1000 IE PMSG erzeugte Titer von 1:32 bis zu 1:128, während das Mischpräparat aus 400 IE PMSG/200 IE HCG bei gleicher Applikation, gegen PMSG getestet, nur bei einem Tier zu einem Titer von 1:32 führte. Wurden diese Seren im PHA-

Test gegen HCG getestet, lag der höchste Antikörpertiter bei 1:4.

Weiterhin wurden von jeder mit HCG behandelten Spezies, bzw. PMSG/HCG-behandelten Schweinen, die Verlaufsproben zweier Tiere im RIA auf Antikörper gegen HCG überprüft. Bei den mit PMSG/HCG-behandelten Schweinen entsprach der positive Antikörpertiter von 1:2 im PHA-Test einer Bindung von 0,2 % im RIA, während sämtliche anderen getesteten Seren keine Bindung ergaben.

Wurden Schweine zweimal mit 500 IE HCG behandelt, ging der maximale Antikörpertiter über 1:32, bzw. über eine Bindung von 0,6 % im RIA nicht hinaus.

Schaf: Nach zweimaliger intramuskulärer Applikation von 1500 IE HCG im Abstand von 14 Tagen lag der höchste Antikörpertiter im PHA-Test bei 1:64, die höchste Bindung im RIA bei 1,6 %.

Pferd: Die zweimaliger Verabreichung von 3000 IE HCG i.m. im Abstand von 14 Tagen führte zu einem Titer von maximal 1:4 im PHA-Test und zu einer Bindung von maximal 7,6 % bei den im RIA getesteten Blutproben.

Hund: Nach zweimaliger intramuskulärer Injektion von 750 IE HCG konnte im PHA-Test maximal ein Titer von 1:4 festgestellt werden. Die Bindung im RIA lag bei den überprüften Seren bei 15,9 %.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß die zweimalige intramuskuläre Applikation eines Hormonpräparates in therapeutischer Dosierung keine klinisch bedeutsamen Antikörpertiter im

Sinne einer Neutralisation induzierten. Immunreaktionen als Ausdruck einer Anaphylaxie sind selten, können aber nicht ausgeschlossen werden. Der Vergleich zwischen den beiden Testmethoden PHA-Test und RIA zeigte, daß der PHA-Test aufgrund der geringen Unterschiede in den Ergebnissen auch heute noch seine Gültigkeit besitzt.

SUMMARY

Antibody formation was examined by the passive haemagglutination test (PHA-test) after administration of PMSG to cattle and swine, PMSG/HCG to swine and HCG to swine, sheep, horse and dog. Additionally from each HCG-treated group blood samples of two animals were tested as spot-checks for antibodies by radioimmunoassay (RIA).

Cattle: Neither a single nor double intramuscular injection of 3000 IE PMSG lead to an antibody formation. The highest titre found was 1:32.

Intracutaneous injections of PMSG in untreated and treated cows (2 x 3000 IE PMSG i.m., respectively PMSG combined with FAC) resulted in all animals in an unimportant increase of the cutaneous thickness however more evident in the pretreated cows. A clear relation between the cutaneous reaction and the different pretreatment or the intracutan applicated dose of the hormone was not recognizable. A general reaction as expression of an immediately reacting allergy could not be observed in any animal.

Swine: The double intramuscular injection of 1000 IE PMSG induced an antibody titre between 1:32 and 1:128. A PMSG/HCG-preparation (400 IE PMSG/200 IE HCG) lead by the same way of administration to a titre rise in one animal to 1:32 when tested against the PMSG-fraction. Tested against HCG the maximal titre was found to be 1:4.

Further the blood samples of two animals each HCG-treated group and PMSG/HCG-treated swine were examined for antibodies against HCG by radioimmunoassay.

In the group of the PMSG/HCG-treated swine the titre of 1:2 in the PHA-test was adequate to a binding of the tracer of 0,2 % in the RIA; the other examined blood samples showed no binding at all.

The double injection of 500 IE HCG to swine resulted in an antibody formation not higher than the titre of 1:32 (PHA-test) respectively a binding of 0,6 % in all examined samples by the RIA.

Sheep: When 1500 IE HCG were administered intramuscular twice within 14 days the maximal antibody titre in the PHA-test was found to be 1:64 and the maximal tracer binding in the RIA was 1,6 %.

Horse: Two intramuscular injections of 3000 IE HCG given within 14 days provoked an antibody formation to a titre of 1:4 (PHA-test) respectively 7,6 % (RIA).

Dog: After double intramuscular administration of 750 IE HCG the highest titre found with PHA-test was 1:4. The maximal binding of the tested blood samples in the RIA was found to be 15,9 %.

These examinations show that the double intramuscular administration of hormones in therapeutical doses doesn't induce a clinically significant antibody formation that means neutrali-

zation of the hormone activity. Immune response like anaphylactoid reactions are unusual but they cannot be excluded. The comparison of the PHA-test and the RIA demonstrated by the minimal differences in the results of both methods that the PHA-test today still possesses its availability.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMOFF, P. (1970)
Antigens and antigenicity
In: Biology of the immune response ed. by P. Abramoff and M.F. La Via, McGraw-Hill Book-Company, New York

AHRENS, M. and W. SCHLEGEL (1978)
Influence of various factors on the reproductive performance of sows after "biotechnical" treatment during the suckling period (PMS/HCG induction of oestrus)
Arch. Tierz. 21: 107-111

AITKEN, M.M. and J. SANFORD (1969)
Experimental anaphylaxis in cattle
J. Comp. Pathol. 79: 131-139

AL-KAFAWI, A.A., M.L. HOPWOOD, M.H. PINEDA and L.C. FAULKNER (1974)
Immunization of dogs against human chorionic gonadotrophin
Am. J. Vet. Res. 35: 261-264

ALLEN, W.R. and F. STEWART (1978)
The biology of pregnant mare serum gonadotrophin
In: Control of reproduction in the cow ed. by J.M. Sreenan, Martinus Nijhoff-The Hague, Boston, London

ASCHHEIM, S. und B. ZONDEK (1927)
Hypophysenvorderlappenhormon und Ovarialhormon im Harn von Schwangeren
Klin. Wochenschr. 6: 1322-1328

BAHL, O.P. (1969)
Human chorionic gonadotropin. II. Nature of the carbohydrate units
J. Biol. Chem. 244: 575-583

BENTHIN, G. and W. RÖSTEL (1978)
Stimulation of oestrus through hormone treatment (chlormadinone acetate and PMSG) in sheep
Tierärztl. Umsch. 33: 174-176

BERCHTHOLD, M., P. ROSCH und R. THUM (1978)
Ovarielle Veränderungen nach GnRH-Applikation bei Kühen mit normalen Ovarfunktionen
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 120: 377-382

BERGFELD, J. and G. EHLERT (1977)
Biotechnical induction of puberty in gilts.
1. Oestrus & ovulation response to Suigonan (PMSG+ HCG) (Vemie) or FSH+HCG mixtures in gilts 200 days old
Arch. exp. Vet. Med. 31: 369-374

BERGFELD, J., G. REINHARDT and J. KÖNIG (1978)
Importance and determination of follicle-stimulating and luteinizing components in PMS preparations
Arch. exp. Vet. Med. 32: 135-140

BINDON, B.M. and L.R. PIPER (1977)
Induction of ovulation in sheep & cattle by injections of PMSG & ovine anti-PMSG immune serum
Theriogenology 8: 171

BIRKEN, S. and R.E. CANFIELD (1978)
Structural and immunochemical properties of human chorio-gonadotropin
In: Structure and function of the gonadotropins ed. by K.W. McKerns, Plenum Press, New York and London

BOSTEDT, H. (1979)
Anwendung von Hormonen in der Fortpflanzungsperiode bei kleinen Wiederkäuern und beim Schwein
Prakt. Tierarzt 7: 602-608

BOSTEDT, H., H.R. SCHUMM, G. AVERDUNK, P. MATZKE und H. BOGNER (1978)
Östrusinduktion während der Laktation beim Schwein
Zuchthyg. 13: 88

BREUER, H. and E. NIESCHLAG (1975)
Antibodies to hormones in endocrinology: inductive remarks
In: Immunization with hormones in reproduction research ed. by E. Nieschlag, North-Holland Publishing Company, Amsterdam

BRODY, S. and G. CARLSTRÖM (1965)
Problems associated with the quantitative immunoassay of human chorionic gonadotropin
In: Gonadotropins: physochemical and immunological properties ed. by G.E.W. Wolstenholme and J. Knight Ciba Foundation, Study Group No 22

BUDDECKE, E. (1971)
Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin

BUSCH, W. (1975)
I. Grundsätze der hormonellen Therapie von Fortpflanzungsstörungen
II. Steuerung der Fortpflanzungsfunktionen mit Hormonen
In: Veterinärmedizinische Endokrinologie ed. by F. Döcke, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart

BUSCHMANN, H. (1970)
Reifung und Alterung der immunologischen Kompetenz
Tierärztl. Umsch. 25: 525-528

BUSCHMANN, H. (1973)
Der Einfluß des Antigens auf die Stärke und Qualität der Immunantwort
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86: 81-84

BUSCHMANN, H. (1974)
Der Einfluß des Geschlechts auf Immunität und Infektionsresistenz
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87: 194-196

CARTER, J. (1976)
The effect of progesterone, oestradiol and HCG on cell-mediated immunity in pregnant mice
J. Reprod. Fert. 46: 211-216

CATCHPOLE, H.R., H.H. COLE and R.B. PEARSON (1935)
Studies on the rate of disappearance and fate of mare gonadotropic hormone following intravenous injection
Am. J. Physiol. 112: 21-26

CATHOU, R.E. (1978)
Solution, conformation and segmental flexibility of immunglobulins
In: Immunglobulins ed. by G.W. Lithum and R.A. Good, Plenum medical Book Company, New York, London

CAVALLI-SFORZA, L. (1964)
Grundbegriffe der Biometrie
Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart

CHIRUS, D.D. and G.S. GREENWALD (1978)
Ovarian follicular development in cyclic hamsters treated with a superovulatory dose of pregnant mare's serum
Biol. Reprod. 19: 895-901

CHRISTAKOS, S. and O.P. BAHL (1979)
PMSG. Purification and physicochemical, biological and immunological characterization
J. Biol. Chem. 254: 4253-4258

CLAMAN, H.N. (1970)
Immunologic memory
In: Biology of the immune response ed. by P. Abramoff and M.F. La Via, McGraw-Hill Book Company, New York

COLE, H.H. (1969)
Physiological characterization of gonadotropins
In: Reproduction in domestic animals ed. by H.H. Cole and P.T. Cupps, sec. Edition, Academic Press, New York, London

COLE, H.H., M. BIGELOW, J. FINKEL and G.R. RUPP (1967)
Biological half-life of endogenous PMSG following hysterectomy and studies on losses in urine and milk
Endocrinology 81: 927-930

COLE, H.H., R. DEWEY, I.I. GESCHWIND and M. CHAPMAN (1975)
Separation of progonadotropic and antigonadotropic activities in ovine and equine HCG antisera
Biol. Reprod. 12: 516-521

COLE, H.H., C. HAMBURGER and A. NEIMANN-SØRENSEN (1957)
Studies on antigonadotrophins with emphasis on their formation in cattle
Acta Endocrinol. 26: 286-302

CRIEP, L.H. (1969)
Fundamentals of immunology
In: Clinical immunology and allergy ed. by L.H. Criep, Grune & Stratton, New York, London

DAVIES, R.V., S.J. MAIN and B.P. SETCHELL (1978)
Inhibin: Evidence for its existence, methods of bioassay and nature of the active material
Int. J. Andrology, Suppl. 2, Part 1: 102-114

DHONDT, D., R. BOUTERS, J. SPINCEMAILLE, M. CORYN and M. VANDE-PLASSCHE (1978)
Control of superovulation in the bovine with a PMSG-antiserum
Theriogenology 9: 529-534

DONINI, S., J. D'ALSESSIO and P. DONINI (1975)
Subunits of human chorionic gonadotrophin: immunological and biological studies
Acta Endocrinol. 79: 749-766

DUBOSE, K.R., J.L. KREIDER and R.A. GODKE (1979)
Effects of GnRH and HCG on oestrus, ovulation and fertility in Quarter Horse mares
J. Anim. Sci. 49: Suppl. 1: 26-27

ELY, C.A. and B.L. CHEN (1967)
Immunochemical studies of the luteinizing hormone. III. Cross-reactions in vivo
Endocrinology 81: 1033-1040

ENBERGS, H. (1965)
Clinical and endocrinological aspects of antigonadotrophins and attemps to produce antiserum against PMSG
Tierärztl. Wschr. 72: 313-319

FABRIS, N. and L. PIANTANELLI (1976)
Effect of chorionic gonadotropins on humoral and cell-mediated immunity
Adv. exp. Med. Biol. 66: 635-638

FARMER, S.W. and H. PAPKOFF (1979)
Immunochemical studies with PMSG (rabbit)
Biol. Reprod. 21: 425-431

FAULKNER, L.C., M.H. PINEDA and T.J. REIMERS (1975)
Immunization against gonadotropins in dogs
In: Immunization with hormones in reproduction research ed.by E. Nieschlag, North-Holland Publishing Company, Amsterdam

FORCELLEDO, M.L. and M. DE LA LASTRA (1977)
Gonadotropin-inhibitory contaminants in partially purified pharmacentical preparations of human chorionic gonadotropin
J. Pharmac. Sci. 66: 1773-1774

FRIESEN, H.G. (1973)
Placental protein and polypeptide hormones
In: Handbook of physiology, Section 7; Endocrinology, Vol. II, Female reproduction system, Part 2: 295-309
The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland

FUNG, H.P. (1979)
Zur Frage der Immunreaktion beim Rind nach therapeutischer Applikation von HCG
Diss. Med. Vet. München

GARVERICK, H.A., D.J. KESLER, T.C. CANTLEY, R.G. ELMORE, R.S. YOUNGQUIST and C.J. BIERSCHWAL (1976)
Hormone response of dairy cows with ovarian cysts after treatment with HCG or GnRH
Theriogenology 6: 413-425

GATES, A.H. and J.L. BOZARTH (1978)
Ovulation in the PMSG-treated immature mouse: effect of dose, age, weight, puberty, season & strain
Biol. Reprod. 18: 497-505

GELL, P.G.H. and R.R.A. COOMBS (1968)
Clinical aspects of immunology
Beackwell, Oxford

GINTHER, O.J. (1979)
Reproductive biology of the mare
Department of Veterinary Science University of Wisconsin-Madoson

GLASS, R.H. and A. MROUEH (1967)
Pregnancy in the rabbit following immunization with human chorionic gonadotropin
Am. J. Obstet. Gynecol. 97: 1082-1084

GÖRING, W. (1980)
Radioimmunologische Bestimmung des menschlichen Harnkallikreins
Diss. Med. München

GOOD, A., M. RAMOS-URIBE, R.J. RYAN and R.D. KEMPERS (1977)
Molecular forms of human chorionic gonadotropin in the serum, urine and placental extracts
Fert. Ster. 28: 846-850

GOSPODAROWICZ, D. (1972)
Purification and physicochemical properties of the pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)
Endocrinology 91: 101-106

GREENWOOD, F.C. and W.M. HUNTER (1962)
Preparation of iodine 131-labelled hCG of high specific activity
Nature (London) 194: 495-496

GRUNERT, E. and G. DIEZ (1976)
Improving the conception rate in cows by means of HCG and GnRH
Zuchthyg. 11: 90

GÖNZLER, O. und E. HUBER (1967)
Einsatz von Hormonen zur Prophylaxe und Therapie der Sterilität des Rindes
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 109: 611-624

HAFEZ, E.S.E., E. RUJAKOSKI, P.B. ANDERSON, O.L. FROST and G. SMITH (1964)
Problems of gonadotropin-induced multiple pregnancy in beef cattle
Am. J. Vet. Res. 25: 1074-1079

HAN, T. (1975)
HCG. Its inhibitory effect on cell mediated immunity in vivo and in vitro
Immunology 29: 509-515

HANSSON, V., E. RENSCH, O. TRYGSTAD, O. TORGERSON, E.M. RITZEN und F.S. FRENCH (1973)
FSH stimulation of testicular androgen binding protein
Nature (London) New. Biol. 246: 56-58

HODSON, H.H. (1980)
Postpartum sows management for maximum reproductive performance
In: Current therapy in theriogenology ed. by D.A. Morrow, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

HURTGEN, J.P. and A.D. LEMAN (1979)
Use of PMSG in the prevention of seasonal post-weaning anoestrus in sows
Theriogenology 12: 207-214

IRVINE, C.H.G. and M.J. EVANS (1979)
Recent advances in reproductive endocrinology of the mare
N. Z. Vet. J. 27: 176-180

ISHIZAKA, K. and P.D. KIND (1970)
Immunologic injury
In: Biology of the immune response ed. by P. Abramoff and M.F. La Via, McGraw-Hill Book Company, New York

JÄGER, L. (1976)
Klinische Immunologie und Allergologie
Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, New York

JAINUDEEN, M.R., E.S.E. HAFEZ, P.D. GOLLNICK and L.A. MOUSTAFA (1966)
Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum injections
Am. J. Vet. Res. 27: 669-675

KALTENBACH, C. (1980)

Initation of puberty and post partum estrus in beef cattle

In: Current therapy in theriogenology ed. by D.A. Morrow, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

KARG, H., D. SCHAMS, B. HOFFMANN und R. CLAUS (1979)

Neue Erkenntnisse der Endokrinologie der Fortpflanzung

Prakt. Tierarzt 7: 561-578

KIND, D. (1970)

Immunoenhancement

In: Biology of the immune response ed. by P. Abramoff and M.F. La Via, McGraw-Hill Book Company, New York

KORNDÖRFER, L. und A. SCHMID-LINDNER (1975)

Vergleichende Behandlungsversuche mit HCG in wässriger Lösung und öliger Suspension bei Ovarialzysten des Rindes

Zuchthyg. 10: 5-9

LASTER, D.B., E.J. TURMAN, D.F. STEPHENS and R.E. RENBARGER (1971)

Ovulation rates of beef cows and heifers treated with equine gonadotropin (PMS) and chorionic gonadotropin (HCG)

J. Anim. Sci. 33: 443-449

LAURENCE, K.A. and S. ICHIKAWA (1968)
Effects of active immunization with bovine luteinizing hormone on reproduction in the female rat
Endocrinology 82: 1190-1199

LEATHEM, J.H. (1944)
The antihormone problem in clinical endocrine therapy
J. Clin. Endocrinol. 4: 500-504

LEATHEM, J.H. and A.E. RAKOFF (1948)
Studies on antihormone specificity with particular reference to gonadotropic therapy in the female
J. Clin. Endocrinol. 8: 262-268

LEIDL, W., H. BOSTEDT, W. LAMPRECHT, R. PRINZEN und V. WENDT (1979)
Zur Ovulationssteuerung mit einem GnRH-Analogon und HCG bei der künstlichen Besamung des Rindes
Tierärztl. Umsch. 34: 546-555

LEIDL, W., B. HIMMER und H.P. FUNG (1980)
Immunologische Folgen einer Therapie mit gonadotropen Hormonen beim Rind
Prakt. Tierarzt, Collegium vet. X: 6-9

LERARIO, A.C., J.G. PIERCE and J.L. VAITUKAITIS (1978)
Effect of conformation of hCG-ß on generation of hCG-specific antibody
Endocr. Res. Comm. 5: 43-55

LORAINE, J.A. (1961)
Human chorionic gonadotrophin (HCG)
In: Hormones in blood ed. by C.H. Gray and A.L. Bacharach, Academic Press, New York, London

LOY, R.G. and J.P. HUGHES (1966)
The effect of human chorionic gonadotrophin on ovulation, length of estrus, and fertility in the mare
Cornell Vet. 56: 41-50

LUBBADEH, W.F., C.N. GRAVES and S.L. SPAHR (1980)
Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows
J. Anim. Sci. 50: 124-127

LUNENFELD, B., C. ISERSKY and M.C. SHELESNYAK (1962)
Immunologic studies on gonadotropins.
I. Immunogenic properties and immunologic characterization of human chorionic gonadotropin preparations (HCG) and their homologous antisera
J. Clin. Endocrinol. Metab. 22: 555-563

MAYR, A. und B. BIBRACK (1969)
Antibiotikaallergien beim Tier
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82: 182 -187

MAYR, A. und B. BIBRACK (1970)
Arzneimittelallergien beim Rind
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 83: 439-449

McDONALD, L.E. (1969)
Veterinary endocrinology and reproduction
Lea & Febiger, Philadelphia

MERKT, H. und E. KLUG (1979)
Anwendung der Hormone beim Pferd
Prakt. Tierarzt 7: 586-592

MERZ, W.E., U. HILGENFELDT, M. DÖRNER and R. BROSSMER (1974)
Biological, immunological, and physical investigations on human chorionic gonadotropin
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1035-1045

MIELKE, H. (1979)
Geschichtliches und Grundlagen der immunbiologischen Beziehung zwischen Muttertier und Frucht beim Rind
Mh. Vet. Med. 34: 217-223

MOORE, W.T. (jr.), D.N. WARD and E.D. BURLEIGH (1979)
Primary structure of PMSG α-subunit
Fed. Proc. 38: 462

MORELL, A.G., G. GREGORIADIS, I.H. SCHEINBERG, J. HICKMAN and G. ASHWELL (1971)
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation
J. Biol. Chem. 246: 1461

MORGAN, F.J., S. BIRKEN and R.E. CANFIELD (1973)
Human chorionic gonadotropin: a proposal for the amino acid sequence
Mol. Cell. Biochem. 2: 97-99

MORGAN, F.J. and R.E. CANFIELD (1971)
Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin
Endocrinology 88: 1045-1053

MORI, K.F. (1970)
Antigenic structure of human chorionic gonadotropin: Importance of protein moiety to the antigenic structure of human chorionic gonadotropin
Endocrinology 86: 97-106

MORI, J., S. HIGAKI and F. HOSODA (1971 a)
Immunological studies on gonadotropins in animal:
V: Cross-reaction of gonadotropins in various spezies of animals with antiserum to bovine luteinizing hormone
Japn. J. Anim. Reprod. 17: 14-19

MORI, J., S. HIGAKI and F. HOSODA (1971 b)
Immunological studies on gonadotropins in animal:
VI: Cross-reaction of animal gonadotropins with antiserum to human chorionic gonadotropin
Japn. J. Anim. Reprod. 17: 20-24

MÖLLER, R. und M. BERCHTHOLD (1980)
Nachweis von spezifischen Antikörpern nach wiederholter HCG-Injektion beim Rind
XI. International Congress on Diseases of Cattle
Tel Aviv, 20.-23. October 1980

MÖLLER, R., M. THALLER, M. BERCHTHOLD und H. LUTZ (1980)
Nachweis von Antikörpern gegen HCG beim Rind mittels GEDELISA
Zentralbl. Vet. Med. A, 27: 685-690

NAKAHARA, T., Y. KANEDA, T. KATAOKA and M. YAMAUCHI (1965)
Studies on the antihormone against pregnant mare serum (anti-PMSG) in cattle
Japn.J. Anim. Reprod. 10: 128-136

NAKAHARA, T., M. YAMAUCHI and T. KATAOKA (1961 a)
Studies on the antihormone against hCG (anti-hCG) in cattle.
I. Experimental formation of the antihormone against human chorionic gonadotropin in cattle
Japn.J. Anim. Reprod. 7: 27-32

NAKAHARA, T., M. YAMAUCHI and T. KATAOKA (1961 b)
Studies on the antihormone against hCG (anti-hCG) in cattle.
II. Formation of anti-hCG in cattle with cystic ovaries following repeated administration of hCG
Japn.J. Anim. Reprod. 7: 32-37

NAKAHARA, T., M. YAMAUCHI, T. KATAOKA, Y. MARUYAMA and Y. KANEDA (1961 c)
Studies on the antihormone against hCG (anti-hCG) in cattle.
III. Hormonal treatment of refractory ovarian follicle cysts in cattle by injecting hCG directly into the cysts
Japn.J. Anim. Reprod. 7: 123-129

NAKAHARA, T., M. YAMAUCHI, T. KATAOKA and Y. KANEDA (1964)
Studies on the antihormone against gonadotropin in cattle
Proc. 5th Internat. Congress Anim. Reprod., Trento, Italy, Vol. III: 338-342

NAKAO, T., Y. NAMATA, M. KUBO and S. YAMAUCHI (1978)
Treatment of cystic ovarian disease in dairy cows. Combined use of progestin and human chorionic gonadotropin
Cornell Vet. 68: 161-178

NEWCOMB, R., W.B. CHRISTIE, L.E.A. ROWSON, D.E. WALTERS and W.E.D. BRUSFIELD (1979)
Influence of dose, repeated treatment and batch of hormone on ovarian response in heifers treated with PMSG
J. Reprod. Fert. 56: 113-118

OHMS, J.I. (1961)
The immunological response of the bovine and rabbit to pregnant mare serum gonadotrophin
Diss. abstr. 22: 4141-4142

PALMER, E. and B. JOUSSET (1975)
Synchronization of oestrus in mares with a prostaglandin analogue and HCG
J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 269-274

PAPKOFF, H. (1969)
Chemistry of the gonadotropins
In: Reproduction in the domestic animals ed. by H.H. Cole and P.T. Cupps, Academic Press, New York, London

PAPKOFF, H. (1978)
Relationship of PMSG to the pituitary gonadotropins
In: Control of reproduction in the cow ed. by J.M. Sreenan, Martinus Nijhoff-The Hague, Boston, London

PAPKOFF, H., T.A. BEWLEY and J. RAMACHANDRAN (1978)
Physicochemical & biological characterizations of PMSG & its subunits
Biochim. Biophys. Acta 532: 185-194

PETRUSZ, P., C. ROBYN and E. DICZFALUSY (1971)
Antigonadotrophic profile of antisera against human chorionic gonadotrophin preparations
II. Biological characterization of the antisera
Acta Endocrinol. 67: 262-276

PIGON, H., M.T. CLEGG and H.H. COLE (1960)
The formation of antigonadotrophin in sheep and its effect on the endocrines and reproductive system
Acta Endocrinol. 35: 253-260

PINEDA, M.H., V.M.D. GINTHER and W.H. McSHAN (1972)
Regression of corpus luteum in mares treated with an antiserum against an equine pituitary fraction
Am. J. Vet. Res. 33: 1767-1773

POLANCO, A., H.H. HERRMANN, F. von KAUFMANN, E. KALM, D. SMIDT and W. HOLTZ (1978)
Induction and timing of ovulation in prepuberal gilts pretreated with PMS/HCG
Zentralbl. Vet. Med. 25: 608-616

POLANCO, A., E. HESSE de POLANCO, E. KALM, D. SMIDT und W. HOLTZ (1980)
Brunstinduktion mit Gonadotropinen bei Sauen während und nach der Laktation unter praktischen Bedingungen
Zuchthyg. 15: 40-46

QUINLIVAN, T.D. (1980)
Estrus synchronization and control of the estrus cycle
In: Current therapy in theriogenology ed. by D.A. Morrow, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

RAO, S.S. and S.K. SHAHANI (1961)
The antigenicity of human chorionic gonadotrophin
Immunology 4: 1-12

RATHAM, P. and B.B. SAXENA (1978)
The structure and function of follicle-stimulating hormone
In: Structure and function of the gonadotropins ed. by K.W. McKerns, Plenum Press, New York, London

REEL, J.R., R.R. HUMPHREY and W.C. DERMODY (1976)
Luteinizing hormone - releasing hormone versus human chorionic gonadotropin: differential effect on the development of ovulatory refractoriness and antibodies
Fert. Ster. 27: 59-64

REICHERT, L.E. (jr.) and P.E. TREADWELL (1967)
Cross-reactivity of antibody to human and bovine luteinizing hormone (LH) with homologous and heterologous LH
Endocrinology 81: 591-598

RHIND, S.M., J.J. ROBINSON, C. FRASER and J. McHATTIE (1980)
Ovulation and embryo survival rates and plasma progesterone concentrations of prolific ewes treated with PMSG
J. Reprod. Fert. 58: 139-144

ROITT, J.M. (1977)
Essential immunology
Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edingburgh, Melbourne

ROLLE, M. und A. MAYR (1978)
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

ROSER, J.F., B.L. KIEFER, J.W. EVANS, D.P. NEELY and C.A. PACHECO (1979)
The development of antibodies to HCG following its repeated injection in the cyclic mare
J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 173-179

ROSS, G.T. (1977)
Clinical relevance of research on the structure of human chorionic gonadotropin
Am. J. Obstet. Gynecol. 129: 795-808

SAUMANDE, J., D. CHUPIN, J.C. MARIANA, R. ORTAVANT and P. MANLEON (1978)
Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation
In: Control of reproduction in the cow ed. by J.M. Sreenan, Martinus Nijhoff-The Hague, Boston, London

SCHAETZ, F. (1977)
Sexualhormone und ihre Anwendung
In: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren ed. by D. Küst und F. Schaetz, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

SCHAMS, D., C. MENZER, E. SCHALLENBERGER, B. HOFFMANN, J. HAHN and R. HAHN (1978)
Some studies on pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle
In: Control of reproduction in the cow ed. by J.M. Sreenan, Martinus Nijhoff-The Hague, Boston, London

SCHAMS, D. and H. PAPKOFF (1972)
Chemical and immunological studies on pregnant mare serum gonadotropin
Biochim. Biophys. Acta 263: 139-148

SCHLEGEL, W. and S. STENZEL (1978)
Influence of various PMS-HCG combinations on oestrus cycle stimulation when used for oestrus synchronization in gilts
Mh. Vet. Med. 33: 661-663

SCHLEGEL, W., S. STENZEL, R. KREBS und M. WÄHNER (1978 a)
Untersuchungen zum Einfluß einer unterschiedlich hohen Dosierung von HCG zur Ovulationsstimulation nach vorausgegangener biotechnischer Pubertätsinduktion
Arch. exp. Vet. Med. 32: 863-867

SCHLEGEL, W., M. WÄHNER and S. STENZEL (1978 b)
Influence of various PMS/HCG combinations used for cycle stimulation in ovulation synchronization of gilts on pregnancy results
Mh. Vet. Med.33: 663-665

SCHLUMBERGER, H.D. and F.A. ANDERER (1969)
Infertility of mice induced by antibodies specific for HCG
Acta endocr. Copenh. 60: 681-688

SCHUHMACHER, G.F.B. (1979)
Immunological factors
Arch. Gynecol. 228: 491-502

SCHUMM, H., H. BOSTEDT, W. PESCHKE, H. BOGNER, P. MATZKE, H. BERNER and G. AVERDUNK (1979)
Reproductive performance of sows given repeated doses of PMSG and HCG for oestrus induction after a shortened suckling period
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92: 352-357

SCHUYLER, L.H., K. ANDERSON, S. SASLAW and C.C. ERICKSON (1950)
A serological study of chorionic gonadotrophin
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75: 552-555

SEGUIN, B. (1980)
Ovarian cysts in dairy cows
In: Current therapy in theriogenology ed. by D.A. Morrow, W.S. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

SELL, S. (1977)
Immunologie, Immunpathologie und Immunität
Verlag Chemie, Weinheim, New York

SHERWOOD, O.D. and W.H. McSHAN (1977)
Gonadotropins
In: Reproduction in domestic animals ed. by H.H. Cole and P.T. Cupps, 3rd edition, Academic Press, New York, San Francisco, London

SIMON, K. (1977)
Graviditätsergebnis nach HCG-Injektion zum Zeitpunkt der Besamung bei wiederholt umrindernden Kühen
Tierärztl. Umsch. 5: 266-270

SMIDT, D. und F. ELLENDORFF (1969)
Fortpflanzungsbiologie der landwirtschaftlichen Nutztiere
BLV Verlagsgesellschaft, München, Basel, Wien

STEFFEN, C, (1968)
Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

STEVENS, V,C. (1977)
Immunological properties of human chorionic gonadotrophin
Biol. Reprod. 29: 1-7

STEVENS, V.C. (1979)
HCG. Properties and potential immunological manipulation for clinical application
Clins Obstet. Gynecol. 6: 549-566

STEWART, F. and W.R. ALLEN (1979)
The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues
J. Reprod. Fert., Suppl. 27: 431-440

STUPNICKI, R. und D. SCHAMS (1974)
Die Verweildauer von menschlichem Choriongonadotropin im Blut beim Rind
Zuchthyg. 9: 32-39

SULLIVAN, J.J., W.G. PARKER and L.L. LARSON (1973)
Duration of estrus and ovulation time in nonlactating mares given human chorionic gonadotropin during three successive estrus periods
J. A. V. M. A. 162: 895-898

TALAAT, M. and K.A. LAURENCE (1969)
Effects of active immunization with ovine FSH on the reproductive capacity of female rats and rabbitts
Endocrinology 84: 185-191

TALAAT, M. and K.A. LAURENCE (1971)
Impairment of spermatogenesis and libido through antibodies to luteinzing hormone
Fert. Ster. 22: 113-118

TALWAR, E.P. (1978)
Anti-HCG immunization
Contraception 18: 19-21

TALWAR, G.P., N.C. SHARMA, S.K. DUBEY, M. SALAHUDDIN, N. SHASTRI and S. RAMAKRISKAM (1976)
Processing of the preparations of ß-subunit of human chorionic gonadotropins for immunization of cross-reactivity with human luteinizing hormone
Contraception 13: 131-139

VAITUKAITIS, J.L. (1978)
Glycoprotein hormones and their subunits- immunological and biological chracterization
In: Structure and function of the gonadotropins ed. by K.W. McKerns, Plenum Press, New York and London

VAITUKAITIS, J.L., G.T. ROSS, L.E. REICHERT (jr.) and D.N. WARD (1972)
Immunologic basis for within and between species cross reactivity of luteinizing hormone
Endocrinology 91: 1337-1342

VOSS, J.L., J.J. SULLIVAN, B.W. PICKETT, W.G. PARKER, L.D. BURWASH and L.L. LARSON (1975)
The effect of HCG on duration of oestrus, ovulation time and fertility in mares
J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 297-301

WAKABAYASHI, K. and B. TAMOAKI (1966)
Influence of immunization with luteinizing hormone upon the anterior pituarity-gonadal system of rats and rabbits, with special reference to histological changes and biosynthesis of luteinizing hormone and steroids
Endocrinology 79: 477-485

WALKER FARMER, S. and H. PAPKOFF (1979)
Immunochemical studies with pregnant mare serum gonadotropin
Biol. Reprod. 21: 425-431

WEBSTER, W.R. (1978)
Evaluation of a PMS & HCG mixture for alleviating summer infertility in sows
Aust. Vet. J. 54: 26-29

WHYMAN, D., D.L. JOHNSON, T.W. KNIGHT and R.W. MOORE (1979)
Intervals betwwen multiple ovulations in PMSG-treated and untreated ovulation and oestrus
J. Reprod. Fert. 55: 481-488

WILLETT, E.L., P.J. BUCKNER and W.H. McSHAN (1953)
Refractoriness of sows repeatedly superovulated with gonadotrophins
J. Dairy Sci. 36: 1083-1088

YAMAUCHI. M. (1970)

Antihormone against gonadotropin in cattle

Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 10: 149-162

YOUNGER, J.B., R.L.S. PIERRE and C.M. ZMIJEKSKI (1969)

Effect of human chorionic gonadotropin in antibody production

Am. J. Obstet. Gynecol. 1: 9-13

ZENIGANIS, R. (1980)

Anestrus in cattle

In: Current therapy in theriogenology ed. by D.A. Morrow, W.S. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto

Herrn Professor Dr. W. Leidl und Herrn Professor Dr. H. Buschmann möchte ich an dieser Stelle für die Oberlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung herzlich danken.

Für die Bereitstellung der Versuchstiere sei dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie, Vorstand: Herr Professor Dr. H. Zucker, und Herrn Professor Dr. D. Giesecke, der Medizinischen Tierklinik, Vorstand: Herr Professor Dr. W. Kraft, dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene, Lehrstuhl: Professor Dr. H. Kräußlich und Herrn Professor Dr. J. Meyer sowie dem Haupt- und Stammgestüt Schwaiganger, Herrn Dr. Wolpert, besonders gedankt.

Zu großem Dank bin ich Herrn Dr. Dr. habil. G. Baljer (Institut für medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Seuchenmedizin) und Herrn Dr. K. Mann (Klinikum Großhadern der Universität München) für die Bereitstellung eines Laborplatzes und die hilfreiche Unterstützung verpflichtet.

Der Firma Bayer (Leverkusen) danke ich besonders für die Bereitstellung der gereinigten Hormonpräparate HCG und PMSG.

LEBENSLAUF

Am 8. März 1954 wurde ich, Angelika Kraus, als Tochter des Dipl. Volkswirts Siegfried Kraus und seiner Ehefrau Helgard Kraus, geb. Staffeldt, in München geboren.

Von 1960 bis 1965 besuchte ich die Volksschule, von 1960 bis Anfang 1961 in Grünwald/München, anschließend in Immenstaad/Bodensee. 1965 wechselte ich in das Progymnasium für Mädchen in Friedrichshafen über und trat 1970 in das Städtische Gymnasium in Lindau ein, wo ich 1973 mein Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät in München das Studium der Veterinärmedizin, das ich im Mai 1979 mit dem Staatsexamen abschloß. Im Juni 1979 erhielt ich die Approbation als Tierärztin und war ab Juli 1979 an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.